

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Diabetesforschung München

Vorstand: Prof. Dr. H. Mehnert

Einfluß von VLDL- und LDL-Lipoproteinen
auf Insulinbindung und Insulinwirkung
an Hepatomazellen in Kultur

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Bernhard Wolf

aus

Regensburg

Jahr

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bachmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert
Prof. Dr. H. Rabes

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. F. Rinninger

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.3.1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Zielsetzung	4
2. Methodik	6
2.1 Verwendete Chemikalien und Geräte	6
2.2 Zellkultur	10
2.2.1 Dauerkultur des Zellstamms (FAO-Hepatoma- zellen)	10
2.2.2 Dauerkultur des Zellstamms (HEP-G2-Zellen) .	12
2.2.3 Splitting der Zellkultur unter Standardbe- dingungen	12
2.3 Präparation der VLDL	13
2.3.1 Allgemeiner Arbeitsgang	13
2.3.2 Gewinnung der Human-VLDL	16
2.3.3 Gewinnung der diabetischen Ratten-VLDL	16
2.4 Präparation der LDL	17
2.5 Präparation des LPDS	19
2.6 Durchführung der Versuche	19
2.6.1 Inkubation mit Lipoproteinen	19
2.6.2 Durchführung der Assays für Insulinbindung und -wirkung	20
2.6.2.1 Ansatz des Versuchsmediums	20
2.6.2.2 Insulinrezeptorbindung an FAO-Hepa- tomazellen	22
2.6.2.3 Insulinrezeptorbindung an HEP-G2- Zellen	22
2.6.2.4 Insulinwirkung an FAO-Hepatoma- zellen	23
2.6.2.5 Insulinwirkung an HEP-G2-Zellen	24
2.6.3 Proteinbestimmung (FAO-Hepatoma- zellen)	24
2.6.4 Proteinbestimmung (HEP-G2-Zellen und LDL- Protein)	25

	Seite
2.6.5 DNA-Bestimmung an FAO-Hepatomazellen	26
2.6.6 Agarose-Elektrophorese der VLDL	27
2.6.7 Statistische Auswertung	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Proteinbestimmung (FAO-Hepatomazellen)	28
3.2 Proteinbestimmung (HEP-G2-Zellen)	30
3.3 DNA-Bestimmung an FAO-Hepatomazellen	31
3.4 Insulinbindung (FAO-Hepatomazellen)	32
3.4.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die In- sulinrezeptorbindung	32
3.4.2 Einfluß von diabetischen Human-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung	35
3.4.3 Einfluß von diabetischen Ratten-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung	37
3.5 Insulinbindung (HEP-G2-Zellen)	40
3.5.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die In- sulinrezeptorbindung an HEP-G2-Zellen	40
3.5.2 Einfluß von normalen Human-LDL auf die Insu- linrezeptorbindung an HEP-G2-Zellen	43
3.6 Insulinwirkung (FAO-Hepatomazellen)	45
3.6.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die In- sulinwirkung	45
3.6.2 Einfluß von diabetischen Human-VLDL auf die Insulinwirkung	48
3.6.3 Einfluß von diabetischen Ratten-VLDL auf die Insulinwirkung	50
3.7 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die Insulin- wirkung an HEP-G2-Zellen	52

	Seite
4. Diskussion	55
4.1 Ausgangssituation in der Literatur	55
4.2 Eigene Ergebnisse	58
4.2.1 Insulinbindung	58
4.2.2 Insulinwirkung	60
4.3 Vergleich der Ergebnisse der in-vitro-Versuche mit klinischen Beobachtungen	61
5. Zusammenfassung	64
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	65
Literaturverzeichnis	66
Lebenslauf	72

1. Einleitung und Zielsetzung

Fettstoffwechselstörungen haben bei Diabetikern eine erhöhte Inzidenz (18,33). Besonders beim Diabetes mit Insulinresistenz bei normalen oder erhöhten Insulinspiegeln (26) sind sekundäre Hyperlipoproteinämien ein sehr häufiger Befund. Dabei steht meist eine Erhöhung der VLDL-Lipoproteine im Vordergrund (15, 16,29).

Inwieweit eine VLDL- bzw. LDL-Erhöhung die Insulinresistenz mitverursacht oder verstärkt, ist noch unklar (35). Bei nicht übergewichtigen Patienten mit primärer Hypertriglyceridämie wurde in verschiedenen Studien eine verschlechterte Glucosetoleranz nachgewiesen (37). Da hier aber eine besondere, vererbte Stoffwechselstörung vorliegt, sind diese Ergebnisse nicht unbedingt auf die Verhältnisse bei hypertriglyceridämischen Typ II-Diabetikern übertragbar. Direkte Studien an hyperlipidämischen Patienten ohne familiäre Hypertriglyceridämie werden jedoch durch eine oft gleichzeitig vorhandene Adipositas erschwert, die alleine bereits eine Insulinresistenz erzeugen kann (17). Dies macht die Suche nach einem realistischen in-vitro-Modell notwendig.

Steiner et al. (36) versuchten deshalb an IM-9-Lymphozyten in Kultur zu zeigen, daß eine Inkubation der Zellen mit VLDL über 24 Stunden die Insulinbindung reduzieren kann. Ein Akuteffekt der VLDL war dagegen nicht erkennbar. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte jedoch kein insulinabhängiger Stoffwechselparameter gemessen werden. Berliner et al. (3) konnten an Aortenendothelzellen in Kultur eine herabgesetzte insulinstimulierte Aminosäureaufnahme (AIB-uptake) nachweisen. Allerdings sind weder Lymphozyten noch das Gefäßendothel als wichtiges Zielgewebe des Insulins anzusehen.

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob in vitro durch VLDL und LDL in physiologischen und supraphysiologischen Konzentrationen die Insulinwirkung im Sinne eines Post-Rezeptor-Effekts modifiziert oder Einfluß auf die Rezeptorbindung ausgeübt wird.

Als Modell für die Leber, dem zentralen Organ des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels dienten hochdifferenzierte FAO-Hepatoma-zellen der Ratte, sowie HEP-G2-Zellen, ein humaner Hepatoma-zellstamm, in Kultur. Nach 24 Stunden Inkubation der Zellen in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Lipoproteinen wurden Insulinbindung und Insulinwirkung bestimmt. Dabei wurden nichtdiabetische VLDL aus Humanserum, diabetische VLDL aus Humanserum sowie diabetische VLDL aus Rattenserum eingesetzt. Weiterhin wurde an HEP-G2-Zellen die Insulinbindung nach Inkubation mit nichtdiabetischen LDL aus Humanserum gemessen.

Die Insulinbindung wurde mit ^{125}J -markiertem Insulin bestimmt, als Parameter der Insulinwirkung wurde die basale und die insulinstimulierte Glykogensynthese aus ^{14}C -Glucose (FAO-Hepatoma-zellen) bzw. ^3H -Glucose (HEP-G2-Zellen) gemessen.

2. Methodik

2.1 Verwendete Chemikalien und Geräte

Albumin:	Serumalbumin vom Rind, elektrophoretischer Reinheitsgrad 100 %, SERVA, Heidelberg
Biuret-Reagenz:	Apotheke des städt. Krankenhauses München-Schwabing
Brutschrank:	Napco 6300
CaCl_2 :	E. Merck, Darmstadt
Citrat:	E. Merck, Darmstadt
CO_2 :	Linde AG, München
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$:	E. Merck, Darmstadt
DNA:	aus Kälberthymus, reinst, Sigma, St. Louis, USA
Dialyseschlauch:	Union Carbide, USA
Diphenylamin:	E. Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium:	Gibco
EDTA:	E. Merck, Darmstadt
Eisessig:	Essigsäure 100 %, Apotheke des städt. Krankenhauses München-Schwabing
Eppendorf-Cups:	1,5 ml und 2,5 ml Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Ethanol:	Roth KG, Karlsruhe
Ethylmercuri-thiosalicylat:	Na-Salz, SERVA, Heidelberg
Filter (Einmalfilter):	0,22 μm , Millex-GS
Filterhalter:	Sartorius

Filtermembranen: 0,2 μ m, Schleicher & Schüll
 Fötale Kälberserum: Boehringer, Mannheim
 Folin-Ciocalteau: Fisher Scientific, USA
 Glucose (nichtradioaktiv):
 D-(+)-Glucose wasserfrei, E. Merck,
 Darmstadt
 Glucose (^{14}C): D-[U- ^{14}C]-Glucose, Amersham
 Glucose (^3H): D-[1- ^3H]-Glucose, Amersham
 Gentamycin: Irvine Scientific, Santa Ana, USA
 Glutamin: L- α -Glutamin, E. Merck, Darmstadt
 Glutathion: Glutathion reduziert, Boehringer,
 Mannheim
 Glykogen: Boehringer, Mannheim
 HCl: HCl 1N, E. Merck, Darmstadt
 Hepes: N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfon-
 säure, Sigma, St. Louis, USA
 Homogenisator: Ultraschallhomogenisator Sonic 125, Braun
 Insulin (für Zellkultur):
 Hoechst-Humaninsulin, Hoechst AG
 Insulin (nichtradioaktiv, für Versuche):
 Insulin-Zn-Complex, Schweineinsulin,
 SERVA, Heidelberg
 Insulin (radioaktiv):
 Mono- ^{125}J -(TYR A14)-Insulin, Novo
 K_2HPO_4 : E. Merck, Darmstadt
 KCl: E. Merck, Darmstadt
 KCN: E. Merck, Darmstadt
 KOH: E. Merck, Darmstadt
 Kulturflaschen: 250 cm^2 , Falcon Labware, Becton and
 Dickinson, USA



Kulturschalen:	Ø 35 mm. Falcon-Primaria, Becton and Dickinson, USA
Lactat:	Boehringer, Mannheim
Medium 199:	10-fach Lösung, Gibco
MEM-essentielle Aminosäuren:	Seromed, München
MEM-nichtess. Aminosäuren:	Seromed, München
MEM-Vitamine:	Seromed, München
NaBr:	E. Merck, Darmstadt
NaCl:	E. Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4 :	E. Merck, Darmstadt
NaHCO_3 :	E. Merck, Darmstadt
Na-K-Tartrat:	E. Merck, Darmstadt
NaOH:	1N, E. Merck, Darmstadt
Paraldehyd:	Fluka AG, Buchs, Schweiz
Penicillin-Streptomycin:	Seromed, München
Phenolrot:	5 g%, Seromed, München
pH-Meter:	Radiometer, Kopenhagen
Photometer:	Eppendorf-Gerätebau, Hamburg
Ratten:	Ivanovas, Kissleg
Reagenzgläser:	Greiner Laborartikel
Scintillationsflüssigkeit:	Kontrogel, Kontron, München
Scintillationszähler:	Packard Liquid Scintillation Counter
Sterile Arbeitsbank:	Steril Guard Hood, The Baker Company, Sanford, Maine, USA

Streptozotocin: Sigma, St. Louis, USA

ICA: Trichloressigsäure, Apotheke des städt.
Krankenhauses München-Schwabing

Triamcinolon: kristallin, SERVA, Heidelberg

Triglycerid-Test: Triglyceride vollenzymatisch, UV-Test,
Boehringer, Mannheim

Trypsin-EDTA: Gibco

Zentrifugen: Eppendorf-Tischzentrifuge, Typ 3200
Hettich Typ "Rotixa"
Ultrazentrifuge Beckman Typ L-65-B,
Beckman Instruments, USA

Zentrifugenbecher (für Ultrazentrifuge):
Beckman Polyallomer centrifuge tubes,
1 x 3 1/2 in. sowie 9/16 x 3 1/2 in.,
Beckman Instruments, USA

2.2 Zellkultur

Als Modell für Hepatozyten wurden FAO-Hepatomazellen, eine hochdifferenzierte Rattenzelllinie (8), bzw. HEP-G2-Zellen, eine humane Hepatomazelllinie (9,28,38), beides genau charakterisierte Zellstämme, in Dauerkultur verwendet.

2.2.1 Dauerkultur des Zellstamms (FAO-Hepatomazellen)

Die FAO-Hepatomazellen wurden über den ganzen Zeitraum, den die Studie in Anspruch nahm, als Monolayers in CO_2 - NaHCO_3 -gepuffertem Medium 199 kultiviert.

Die genaue Zusammensetzung des Kulturmediums ist aus Tab. 1 ersichtlich.

Tab. 1

Zusammensetzung des Kulturmediums

10	ml Medium 199 (10-fach)
	(enthält: Glucose 5 mM/l
	L- α -Glutamin 0,685 mM/l
	L-Methionin 30 mg/l)
ad 100	ml H_2O dest.
4,125	ml NaHCO_3 800 mM
5	ml FKS
1	ml Penicillin-Streptomycin
1	ml Glutamin 200 mM
	+ Insulin 2,5 $\mu\text{U/ml}$
	+ Triamcinolon 0,04 $\mu\text{g/ml}$

Insulin und Triamcinolon wurden dem Kulturmedium zur Verbesserung der Vitalität der Zellen zugesetzt.

Nach dem Ansatz unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Arbeitsbank wurde das Kulturmedium vor Zugabe zu den Zellen sterilfiltriert (vorher Sterilisation des Filtergeräts über 3 Stunden bei 180° C), um jegliche Kontamination durch Bakterien oder Pilze auszuschließen.

Für die Kultur der Hepatomazellen wurden Kunststoff-Kulturflaschen mit 250 cm² Oberfläche verwendet. Die Zell-Monolayers wurden mit 30 ml Kulturmedium inkubiert, das alle 48 Stunden gewechselt wurde. Die Temperatur in der Zellkultur betrug konstant 37° C, der pH-Wert 7,4. Die Einstellung der CO₂-Spannung erfolgte automatisch und wurde über Messung des pH-Wertes in einer Probeflasche mit Kulturmedium mittels eines Blutgasanalyzers (Gas-check im Routinelabor des klinisch-chemischen Instituts) kontrolliert. Die Osmolarität des Mediums wurde mit einem Gefrierpunktniedrigungs-Osmometer regelmäßig bestimmt; sie lag bei allen Messungen zwischen 300 und 310 mosm. Die Luft im Inkubator war wasserdampfgesättigt. Um eine Pilzinfektion zu verhindern, war das zur Luftbefeuchtung verwendete destillierte Wasser mit Ethylmercuri-thiosalicylat versetzt.

2.2.2 Dauerkultur des Zellstamms (HEP-G2-Zellen)

Die HEP-G2-Zellen wurden weitgehend unter den gleichen Bedingungen wie die FAO-Hepatoma-Zellen kultiviert; als Medium diente hier aber Hepes-gepuffertes Dulbecco's Modified Eagle Medium, das mit 10 % FKS und Gentamycin (50 mg/ml) versetzt war, auf eine pH-Einstellung in CO₂-Atmosphäre konnte also verzichtet werden.

2.2.3 Splitting der Zellkultur unter Standardbedingungen

Unter Berücksichtigung der Zelldichte in den Kulturflaschen (Kontrolle unter dem Phasenkontrastmikroskop) wurden die Zellen im Abstand von 1 Woche gesplittet, d.h. im Verhältnis 1:2 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Der Arbeitsablauf war dabei für FAO-Hepatomazellen und HEP-G2-Zellen identisch.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

Zusätzlich zum für den jeweiligen Zellstamm üblichen Kulturmedium wurde noch Hepes-gepuffertes Waschmedium angesetzt (Zusammensetzung siehe Tabelle 2), das kein Kälberserum, sondern Rinderalbumin enthielt, um eine möglichst gleichmäßige Suspendierung der Zellen zu erreichen. Beide Medien wurden nach sterilem Ansatz nochmals sterilfiltriert. Nach Entnahme der Kulturflaschen aus dem Brutschrank wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellmonolayers mit 15 ml sterilem PBS (Zusammensetzung 140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM K₂HPO₄, eingestellt mit HCl 1N auf pH 7,4) überschichtet. Diese Wäsche sollte die Serumproteine entfernen, da diese die Trypsin-EDTA-Aktivität hemmen. Dann wurde das PBS abgesaugt, die Monolayers mit 10 ml Trypsin-EDTA überschichtet und die Kulturflaschen für 5 min bei 37° C im Brutschrank (wasserdampfgesättigte Atmosphäre, keine CO₂-Zugabe) inkubiert. Danach wurden die jetzt im Trypsin-EDTA suspendierten Zellen mit einer Pasteurpipette in vorbereitete, sterile Zentrifugenröhrchen mit Waschmedium (je Röhrchen 60 ml Waschmedium und 40 ml Zellsuspension) überführt

und 5 min schonend bei 1000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, dann das Zellpellet in 40 ml Waschmedium je Zentrifugenröhrchen resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann auf 8 Kulturflaschen (5 ml/Flasche), die jeweils 25 ml Kulturmedium enthielten, aufgeteilt. Nach 24 Stunden wurde der erste Mediumwechsel mit Kulturmedium durchgeführt.

Tab. 2

Zusammensetzung des Waschmediums

10	ml Medium 199 (10-fach)
ad 100	ml H ₂ O dest.
2	ml Hepes 1M
0,5	ml NaHCO ₃ 800 mM
1,0	ml Albumin (Stammlösung 100 g/l)
0,5	ml Glucose 1M

eingestellt auf pH 7,4 mit NaOH 1N (etwa 350 µl NaOH 1N)

2.3 Präparation der VLDL

2.3.1 Allgemeiner Arbeitsgang

Die VLDL zur Inkubation der Zellen wurden folgendermaßen präpariert:

Das Serum (bzw. das Citrat-Plasma bei Ratten-VLDL) wurde mit EDTA versetzt (Konzentration 1 mg/ml) und anschließend bei ca. 100.000 g in einer Beckman L-65-B Ultrazentrifuge 18 Stunden bei 4° C, Rotor SW 27, zentrifugiert. Auf einen gesonderten Zentrifugenlauf zur Entfernung eventuell vorhandener Chylomikronen konnte verzichtet werden, da nur Nüchternserum bzw. -plasma für die VLDL-Gewinnung verwendet wurde. Trotzdem wurden zur Kontrolle im klinisch-chemischen Institut am städtischen Krankenhaus München-Harlaching stichprobenartig Lipidelektrophoresen durchgeführt, die keine Chylomikronen nachwiesen.

Nach dem ersten Zentrifugenlauf wurde der milchige Überstand (VLDL) vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen, in einem Kunststoffreagenzglas gesammelt und danach in die Zentrifugenröhrchen (9/16 x 3 1/2 in) für einen SW-65-Rotor pipettiert. Diese Röhrchen wurden mit dem Überstand nur zur Hälfte gefüllt. Als nächstes wurde der lipidhaltige Überstand mit dem gleichen Volumen an 0,9 %iger Kochsalzlösung, die mit EDTA 1 mg/ml versetzt war, überschichtet und bei ca. 275.000 g nochmals 18 Stunden bei 4° C zentrifugiert, um die Plasmaproteine weitestgehend zu entfernen und die VLDL höher zu konzentrieren. Danach wurde der Überstand abgenommen und in einen Dialyseschlauch gefüllt. Anschließend erfolgte eine Dialyse bei 4° C auf einem Magnetrührer für 72 Stunden gegen das 200fache Volumen an Dialysemedium (20). Das Dialysemedium (NaCl 0,9 %, Glutathion red. 0,65 mM, pH 7,4 für FAO-Hepatomazellen; EDTA 1 mg/ml anstatt Glutathion für HEP-G2-Zellen) wurde während dieser Zeit dreimal gewechselt.

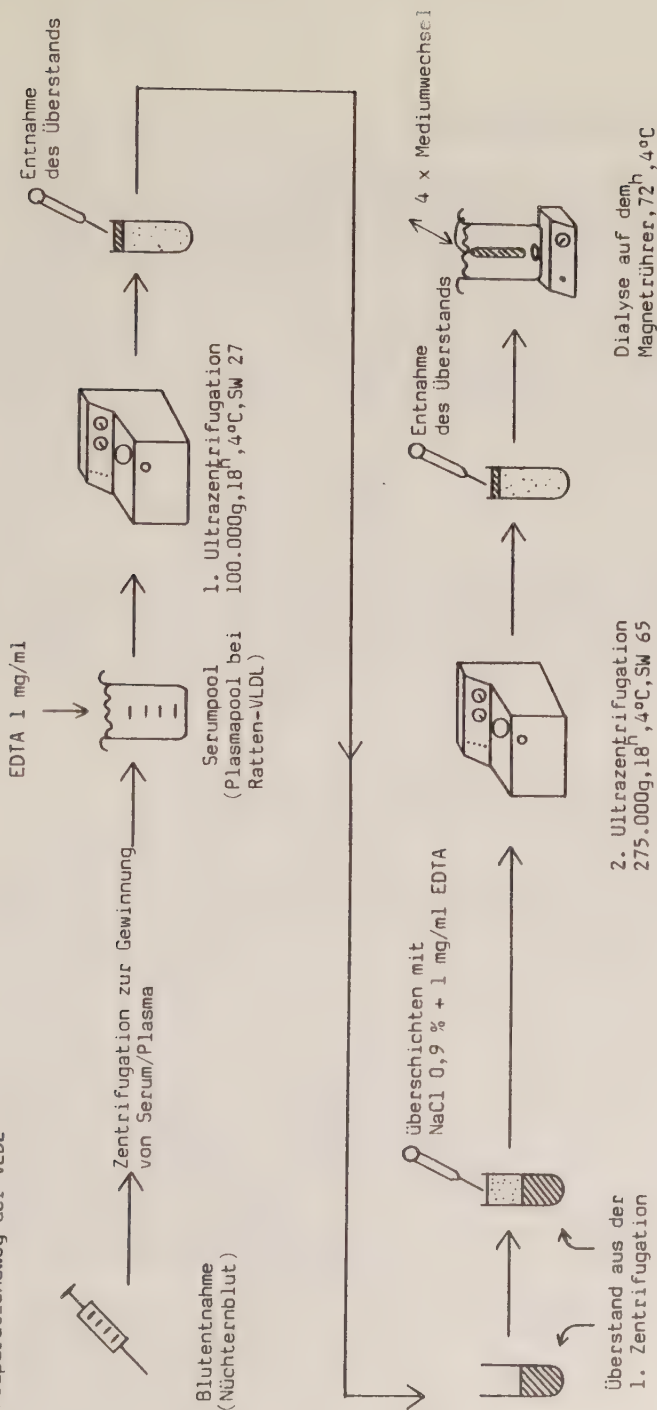
Die so gewonnenen VLDL wurden jeweils vor Beginn der Inkubation aus dem Dialyseschlauch entnommen. Die Konzentration der VLDL wurde mit einem kommerziellen Triglycerid-Test bestimmt. Im Ergebnisteil ist die Konzentration der VLDL als VLDL-TG angegeben, wobei VLDL sich wie folgt zusammensetzen (27): Triglyceride 50 %, Cholesterin 22 %, Phospholipide 18 %, Apoprotein 10 % (diese Prozentwerte weisen eine gewisse Streubreite auf).

Zweck der Dialyse war es einerseits, die Salz-Ionen-Konzentration in der wässrigen Umgebung der Lipoproteine zu standardisieren, andererseits eine Oxydation der Lipoproteine zu verhindern bzw. Produkte einer solchen Oxydation zu entfernen. Oxydierte Lipoproteine wirken in der Zellkultur zytotoxisch (1,6,14,19,20), ohne Dialyse kommt es zum Abfall der Proteinmenge je Zellkulturschale und zu einem veränderten Ergebnis der Versuche.

Die Präparation der VLDL ist in Abb. 1 nochmals im Zusammenhang dargestellt.

Abb. 1

Präparationsweg der VLDL



2.3.2 Gewinnung der Human-VLDL

Die nichtdiabetischen Human-VLDL wurden aus gepooltem Nüchternserum, das aus den morgendlichen Blutentnahmen der Patienten am städtischen Krankenhaus München-Schwabing stammte, präpariert.

Nach verschiedenen Untersuchungen haben diabetische VLDL eine gegenüber VLDL aus dem Blut gesunder Probanden leicht veränderte Zusammensetzung (13). Da es in erster Linie Ziel dieser Studie war, Schlüsse auf die Verhältnisse bei Diabetikern zu ziehen, wurden, um einen eventuell veränderten Effekt diabetischer VLDL zu erfassen, auch diabetische VLDL für die Versuche verwendet. Diese wurden aus dem gepoolten Serum Typ II-diabetischer, mäßiggradig hypertriglyceridämischer Patienten gewonnen (mittlere Triglycerid-Konzentration im Serum der Versuchspersonen 276 mg%). Zur Präparation der diabetischen Human-VLDL wurde je Experiment durchschnittlich Blut von 5 Patienten verwendet.

2.3.3 Gewinnung der diabetischen Ratten-VLDL

Die Ratten-VLDL - tierische Lipoproteine unterscheiden sich in Einzelheiten ihrer Zusammensetzung von humanen (7) - wurden aus dem Blut streptozotocin-diabetischer, männlicher Sprague-Dawley-Ratten präpariert. Der Streptozotocin-Diabetes wurde folgendermaßen induziert (2): 225 mg Streptozotocin wurden in 10 ml 0,05 M Citratlösung gelöst (die Lösung ist nicht stabil und muß innerhalb von 5 min nach Ansatz injiziert werden), sterilfiltriert und in die Schwanzvene injiziert (0,2 ml/100 g Körpergewicht, d.h. 45 mg Streptozotocin/kg Körpergewicht). Während der ersten 24 Stunden nach der Injektion wurde dem Trinkwasser der Ratten 5 % Glucose zugesetzt, um einer Hypoglykämie mit massiver Insulinausschüttung durch Nekrose der Inselzellen vorzubeugen.

Der Erfolg der Streptozotocin-Behandlung wurde durch Glucosebestimmung im Rattenblut ermittelt; dabei ergab sich eine

durchschnittliche Konzentration im Nüchternblut von 243 mg/100 ml am 5. Tag nach der Injektion.

5 - 7 Tage nach der Streptozotocin-Injektion erfolgte die Blutentnahme; die Tiere wurden dazu mit Nembutal narkotisiert. Das Blut (Gerinnungshemmung durch Citrat) wurde nach Eröffnung der Bauchdecke mit einer Einmalspritze aus der V. cava inf. abgenommen.

6 Stunden vor der Blutentnahme mußten die Tiere fasten, um einer Verunreinigung des Plasmas durch Chylomikronen vorzubeugen.

2.4 Präparation der LDL

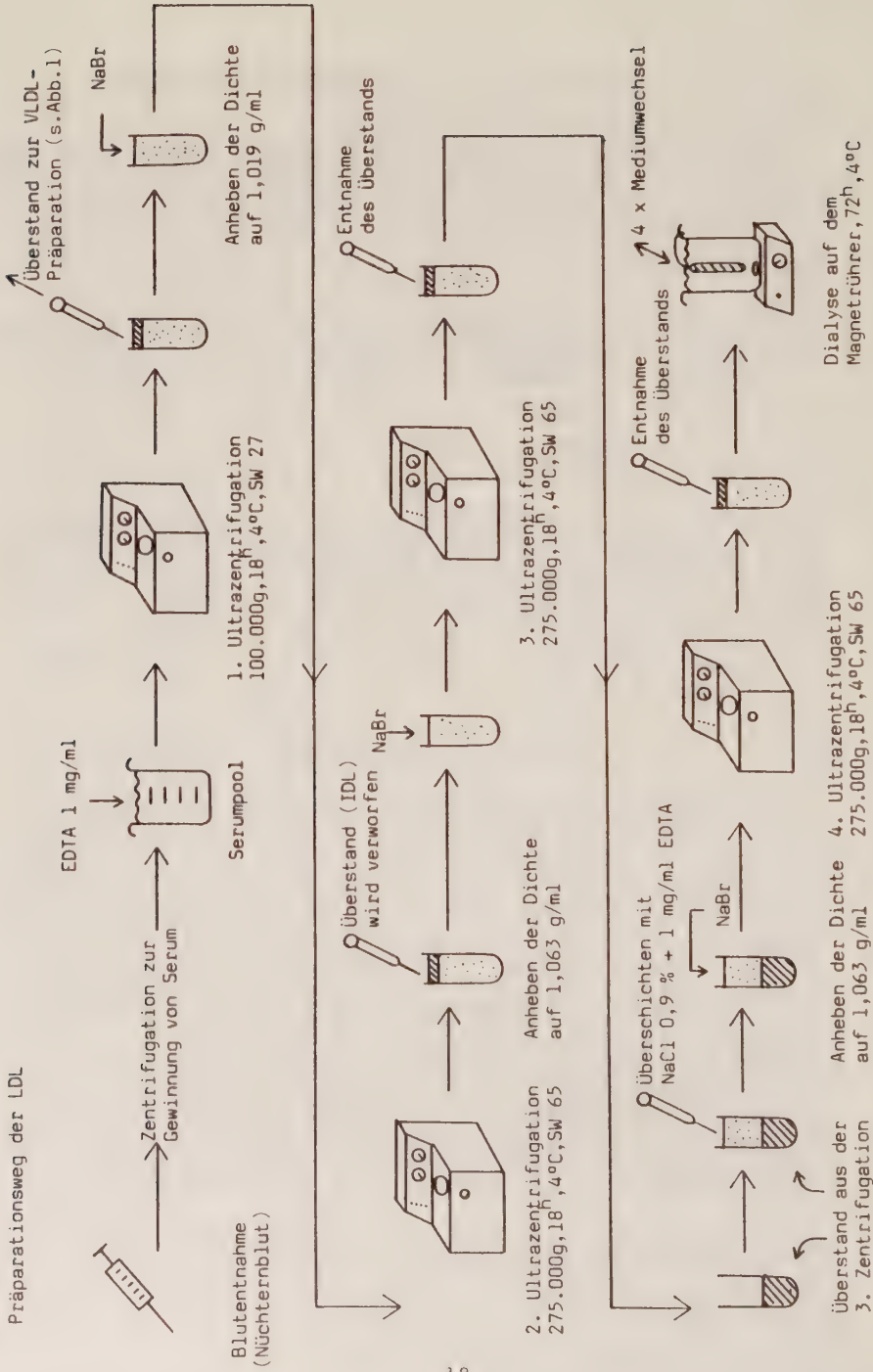
Die LDL wurden aus demselben gepoolten menschlichen Nüchternserum präpariert wie auch die VLDL. Nach der ersten Zentrifugation zur VLDL-Gewinnung bei $d = 1,006$ g/ml, VLDL im Überstand (siehe 2.3.1), wurde die Dichte mit NaBr auf $d = 1,019$ g/ml erhöht und bei 275.000 g 18 Stunden zentrifugiert (4 °C). Die IDL im Überstand wurden abgenommen und verworfen. Anschließend wurde die Dichte auf 1,063 g/ml angehoben und wieder 18 Stunden bei 275.000 g (SW 65-Rotor) zentrifugiert. Der jetzt LDL-haltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen, mit dem gleichen Volumen EDTA-haltiger (1 mg/ml), 0,9 %iger Kochsalzlösung überschichtet und nochmals 18 Stunden bei 275.000 g zentrifugiert (Wäsche). Danach erfolgte auch hier eine Dialyse (siehe 2.3.1); als Dialysemedium diente dabei PBS (Zusammensetzung siehe 2.2.3), dem 1 mg/100 ml EDTA zugesetzt war. Die LDL-Konzentration wurde als LDL-Protein mit der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (siehe 2.6.4) ermittelt.

Vor Proteinbestimmung erfolgte die Delipidierung der LDL. Dazu wurden die Lipoproteine mit 1 ml Chloroform (rein) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chloroform ging dabei mit Lipid in den Unterstand, das Protein in die obere wässrige Phase.

Der Präparationsvorgang ist in Abb. 2 dargestellt.

Abb. 2

Präparationsweg der LDL



2.5 Präparation des LPDS

Für die Versuche mit HEP-G2-Zellen wurde anstatt des FKS humanes LPDS (Lipoprotein deficient serum) verwendet. Dieses LPDS wurde folgendermaßen präpariert:

Humanserum wurde mit NaBr zur Anhebung der Dichte auf 1,21 mg/ml versetzt und für 48 Stunden bei 300.000 g zentrifugiert (4° C). Anschließend wurde der lipidhaltige Überstand verworfen.

Das so erhaltene LPDS wurde dialysiert wie unter 2.4 beschrieben, um das NaBr vollständig zu eliminieren, und anschließend im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

2.6 Durchführung der Versuche

2.6.1 Inkubation mit Lipoproteinen

Die Zellen wurden, wie in 2.2.3 beschrieben, gesplittet, jedoch jetzt auf Kulturschalen (Ø 35 mm) verteilt (Plating). Dem Kulturmedium für FAO-Hepatomazellen waren dabei keine Hormone mehr zugesetzt. Nach jeweils 24 Stunden wurde das Kulturmedium (1 ml/Schale) gewechselt, nach insgesamt 72 Stunden begann die Inkubation mit VLDL. Dabei wurden in der Versuchsgruppe dem Kulturmedium VLDL in einer Konzentration von 500 mg% (VLDL-IG, siehe 2.3.1) oder 50 mg% zugesetzt. Dem Medium für HEP-G2-Zellen war anstatt des FKS 10 % LPDS zugesetzt. Danach wurde das Gemisch sterilfiltriert und 1 ml/Schale in die Zellkultur gegeben. In der Kontrollgruppe wurde dem Inkubationsmedium anstatt der Lipoproteine das gleiche Volumen an physiologischer Kochsalzlösung beigemischt.

Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden lang mit VLDL bzw. NaCl 0,9 % unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Die Inkubation mit LDL wurde nach derselben Methode durchgeführt; die LDL-Konzentration (LDL-Protein) betrug hierbei 50 mg%.

2.6.2 Durchführung der Assays für Insulinbindung und -wirkung

2.6.2.1 Ansatz des Versuchsmediums

Für die Insulinbindungsassays an FAO-Hepatomazellen sowie für alle Insulinwirkungsassays wurde, an Stelle des normalen, NaHCO_3 -gepufferten Kulturmediums, ein Hepes-gepuffertes Versuchsmedium verwendet.

Die Zusammensetzung dieses Mediums ist aus Tab. 3 ersichtlich.

Hauptvorteil dieses Versuchsmediums war neben der Hepes-Pufferung, die eine Versuchsdurchführung ohne CO_2 -Atmosphäre erlaubte, die Möglichkeit, die Glucosekonzentration zu variieren, was für die Insulinwirkungsversuche wichtig war.

Die Insulinbindungsversuche an HEP-G2-Zellen wurden in Hank's Hepes-Puffer durchgeführt.

Tab. 3

Versuchsmedium

Ansatz für 100 ml:	Endkonz.	
Medium nach Dulbecco (Konzentrat)*	12,2 ml	
Hepes 1 M	2,0 ml	20 mM
NaHCO ₃ 800 mM	0,5 ml	4 mM
L- α -Glutamin 200 mM	2,0 ml	4 mM
Glucose 1 M	0,5 ml	5 mM
(bei Insulinwirkungsassays Glucosekonz. entsprechend der Fragestellung)		
Lactat 1 M	0,5 ml	5 mM
NaOH 1 N	0,5 ml	5×10^{-3} N
Albumin 10 g%	1,0 ml	0,1 g%
H ₂ O dest.	ad 100 ml	
pH 7,4 eingestellt mit NaOH 1 N bzw. HCl 1 N		

* Zusammensetzung des Mediums nach Dulbecco (Konz.):

MEM-Vitamine	200 ml
MEM-ess. As.	200 ml
MEM-nichtess. As.	100 ml
Kultur-Earl 20-fach**	500 ml
CaCl ₂ 140 mM	100 ml
Phenolrot 5 g%	2 ml
	1102 ml

** Kultur-Earl 20-fach:

NaCl 2,326 M; KCl 0,107 M; MgSO₄ $\times$ 7 H₂O 0,016 M;
 NaH₂PO₄ 0,023 M

2.6.2.2 Insulinrezeptorbindung an FAO-Hepatomazellen

Zur Bestimmung der Insulinrezeptorbindung wurden die Zellen mit Mono-¹²⁵J-(TYR A14)-Insulin nach Standardmethoden inkubiert (21,32). Der Versuch lief folgendermaßen ab:

Nach der Inkubation mit VLDL oder physiologischer Kochsalzlösung wurden die Schalen viermal mit PBS (4° C) gespült. Anschließend wurden die Zellen 1 Stunde bei 20° C mit Versuchsmedium vorinkubiert. Dann wurde das Vorinkubationsmedium abgesaugt und der eigentliche Versuchsansatz, d.h. Medium + ¹²⁵J-Insulin + nichtradioaktives Insulin (Konzentrationen siehe 3.4.1), in die Schalen gefüllt (Verdünnung des nichtradioaktiven Insulins in einer Verdünnungsreihe mit Versuchsmedium). Die Bestimmung der unspezifischen ¹²⁵J-Rezeptorbindung erfolgte mit nichtradioaktivem Insulin im Überschuß.

Nach 2 Stunden Inkubation bei 20 ° C wurde das Versuchsmedium abgesaugt und die Schalen dreimal mit PBS (4° C) gespült. Um die Zellen von der Oberfläche abzulösen wurden danach 0,5 ml 30 %iger KOH auf jede Schale gegeben und 15 min bei 37° C inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit einer Pasteurpipette in ein Zählröhrchen überführt, die Schale nochmals mit 0,5 ml 30 %iger KOH gespült und diese Lösung ebenfalls in das Zählröhrchen pipettiert. Schließlich wurden die Proben für 10 min in einem γ-counter gezählt.

2.6.2.3 Insulinrezeptorbindung an HEP-G2-Zellen

Die Insulinbindungsversuche wurden prinzipiell so durchgeführt wie oben beschrieben. Ziel der Versuche an dieser Zelllinie war es, mit menschlichen Lipoproteinen im homologen System zu arbeiten.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen mit 2 x 0,2 ml NaOH (0,2 mol/l) von den Schalen abgelöst und 20 s in einem Eppendorfcup mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Von dieser Suspension wurde jeweils ein Aliquot von 2 x 0,04 ml für die Proteinbestimmung verwendet. Der Rest wurde im

γ -counter gezählt; die erhaltenen Werte wurden um die für die Proteinbestimmung verwendete Menge korrigiert. Die LDL-Konzentration wurde als LDL-Protein mit der Proteinbestimmungsmethode nach Lowry (siehe 2.6.4) gemessen.

2.6.2.4 Insulinwirkung an FAO-Hepatomazellen

Die Insulinwirkung wurde über die basale und insulinstimulierte Glykogensynthese aus radioaktiv markierter Glucose bestimmt (4,32).

Nach der Inkubation mit VLDL wurden die Schalen zweimal mit PBS gespült und anschließend mit glucosefreiem Inkubationsmedium (1 ml) 1 Stunde bei 37° C vorinkubiert. Zweck dieser Vorinkubation war es, die Zellen möglichst weitgehend an Glykogen zu verarmen und so einen besseren Einbau radioaktiver Glucose zu erreichen.

Danach wurde das Vorinkubationsmedium abgesaugt und der eigentliche Versuchsansatz (1 ml) in die Schalen gefüllt. Dieser enthielt Inkubationsmedium (Konzentration an nichtradioaktiver Glucose 2,5 mM), ^{14}C -Glucose (250.000 cpm/Schale $\hat{=}$ $0,4382 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/Schale}$), beim stimulierten und beim unspezifischen Wert außerdem noch Insulin in einer Konzentration von 1000 $\mu\text{U/ml}$. Die Inkubation erfolgte 2 Stunden bei 37° C, der unspezifische Wert (Nullwert) wurde stattdessen bei 4° C inkubiert; anschließend wurde das Medium abgesaugt und dreimal mit PBS (4° C) gespült. Dann wurden die Zellen mit 2 x 1 ml 30 %iger KOH von den Schalen abgelöst und in verschließbare Schliffgläsern überführt, die jeweils 2 ml einer vorbereiteten Lösung mit Träger-Glykogen enthielten (5 mg Glykogen/ml Versuchsmedium). Im nächsten Arbeitsgang wurden die Zellen durch 30minütiges Kochen im Wasserbad aufgeschlossen. Danach wurden die Gläser in Eis abgekühlt, der Inhalt in vorbereitete Reagenzgläser mit jeweils 6 ml (0° C) 100 % Ethanol überführt und bei 3000 Upm in der auf - 4° C gekühlten Zentrifuge 10 min zentrifugiert. Das Glykogen setzte sich dabei als Pellet ab. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet nach Überschichten

mit 6 ml Ethanol (0° C) nochmals zentrifugiert (Wäsche). Anschließend wurde das Pellet in 750 µl H₂O (37° C, Wasserbad, Mischer) vollständig aufgelöst. Schließlich wurde die Lösung in Szintillationsröhrchen mit jeweils 15 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und in einem Szintillationszähler gezählt.

2.6.2.5 Insulinwirkung an HEP-G2-Zellen

Die Messung der Insulinwirkung erfolgte prinzipiell wie oben beschrieben; als radioaktiver Tracer diente ³H-Glucose (4 µCi D-[1-³H]-Glucose/Schale, spezifische Aktivität der Stammlösung 5,7 Ci/mmol). Die Glucose-Konzentration betrug 5,5 nM/l an nichtradioaktiver Glucose. Dies erforderte eine höhere Zugabe von Tracer; die Aktivität/Schale war damit um den Faktor 20 höher als bei den Versuchen mit FAO-Hepatomazellen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2 x 0,4 ml 30 %iger KOH von den Schalen abgelöst. Aus jeder Schale wurden 2 x 0,03 ml für die Proteinbestimmung verwendet und der erhaltene Zählwert entsprechend korrigiert.

2.6.3 Proteinbestimmung (FAO-Hepatomazellen)

Die Proteinbestimmung erfolgte hier nach der Biuret-Methode. Dazu wurden die Proben viermal mit PBS gespült, dann das Protein mit 2 x 1 ml 5 %iger TCA aus den Schalen gefällt und in Eppendorfcups überführt. Anschließend wurde die Suspension für 2 min in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden die Cups mit 2 ml 5 %iger TCA aufgefüllt, erneut 2 min zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen und das Pellet mit 2 ml Biuret-Reagenz überschichtet. Dann wurden die Proben bis zur vollständigen Lösung des Pellets bei 37° C in einem Wärmeblock inkubiert und vor der Messung 10 min auf einen Rüttler gestellt. Anschließend wurde die Lösung in Einmalkuvetten pipettiert und bei 546 nm

im Photometer die ersten Extinktionswerte bestimmt. Nach Zugabe von 50 μ l einer KCN-Lösung (330 mg/ml) ergaben sich die zweiten Extinktionswerte. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden Verdünnungen von Standard Labtrol 7,5 g% hergestellt und wie Proben behandelt (Verdünnungsreihe, Eichkurve siehe 3.1).

2.6.4 Proteinbestimmung (HEP-G2-Zellen und LDL-Protein)

Für die Proteinbestimmungen zu den Versuchen mit HEP-G2-Zellen standen nur wesentlich kleinere Proben zur Verfügung, da von jeder Schale ein Aliquot entnommen wurde. Daher wurde anstatt der Biuret-Methode die bei sehr kleinen Proteinmengen genauere Methode nach Lowry (25) angewendet. Der Arbeitsablauf war dabei wie folgt:

Zuerst wurde ein Phenolreagenz, ein Lowry-Reagenz A sowie ein Kupfer-Reagenz angesetzt (Zusammensetzung der einzelnen Reagenzien siehe Tab. 4). Das Probevolumen wurde durch Zugabe von NaCl 0,9 % auf jeweils 100 μ l vergrößert. 50 ml des Lowry-Reagenz A wurden mit 0,5 ml der CuSO_4 -Lösung vermischt.

Der eigentliche Ansatz enthielt 100 μ l Probevolumen, 1,5 ml der Mischung Lowry-Reagenz A - CuSO_4 -Lösung sowie 100 μ l Phenol-Reagenz.

Anschließend wurde der Ansatz gut gemischt (Vortex) und im Photometer bei 660 nm die Extinktion bestimmt. Mit einer Standard-Labtrol-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt.

Diese Proteinbestimmungsmethode fand in genau gleicher Weise auch für die Messung des LDL-Proteins Verwendung.

Tab. 4

Reagenzien für die Proteinbestimmung nach Lowry

Phenol-Reagenz 2 N Folin-Ciocalteu

enthält	Na-Wolframat x $2H_2O$	10	%
	Na-Molybdat x $2H_2O$	2,5	%
	Phosphorsäure (85 %)	5	%
	$LiSO_4$	15	%
	Br_2	0,001	%

für den Versuchsansatz 1 : 1 verdünnt mit H_2O dest.

Lowry-Reagenz A

enthält	Na_2CO_3	20	g
	NaOH	4	g
	Na-K-Tartrat	0,2	g
	H_2O ad 1000 ml		

Kupfer-Reagenz 1 % $CuSO_4 \times 5 H_2O$

2.6.5 DNA-Bestimmung an FAO-Hepatomazellen

Zur Beurteilung der Vitalität der Zellen bzw. zum Ausschluß einer eventuellen oxydativ bedingten Zytotoxizität der VLDL wurde an mit normalen Human-VLDL behandelten Zellen sowie an Kontrollzellen zusätzlich eine DNA-Bestimmung durchgeführt (31).

Nach der Inkubation mit VLDL wurden die Schalen zweimal mit PBS gespült und dann die Zellen mit $2 \times 0,5$ ml PBS abgekratzt und in Eppendorfcups überführt. Anschließend wurden die Proben 2 min in einer Eppendorf-fischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurden 100 μ l NaOH 5 mM und 200 μ l

PCA (5 %) zugegeben und mit einem Ultraschallhomogenisator die Zellmembranen aufgeschlossen. Nach 30 min bei 70° C im Wasserbad wurden die Proben im Eisbad abgekühlt und 600 µl DNA-Reagenz (100 ml Eisessig; 10 µl Paraldehyd; 2,25 g Diphenylamin; Ansatz in dieser Reihenfolge) in jeden Cup pipettiert. Anschließend wurde die Lösung 12 Stunden bei Zimmertemperatur unter Lichtabschluß inkubiert und im Photometer bei 595 nm die Extinktion bestimmt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden Verdünnungen einer DNA-Eichlösung (Stammlösung 74,4 µg/ml) verwendet.

2.6.6 Agarose-Elektrophorese der VLDL

Konzentrationsmessungen der Lipoproteine vor und nach der Inkubation ergaben einen geringfügigen Anstieg der VLDL-IG-Konzentration, der vermutlich durch Verdunstung von Kulturmedium bedingt war. Um eine Strukturveränderung der Lipoproteine durch Metabolismus auszuschließen, die die Wirkung verändern könnte, wurde eine Agarose-Elektrophorese durchgeführt. Als Puffer diente dabei Na-Barbital-Puffer; die Elektrophorese lief bei 90 V über 35 min. Der Film wurde vor der Anfärbung über Nacht luftgetrocknet. Dabei ergab sich keine Strukturveränderung im Vergleich der Lipoproteine vor und nach Inkubation.

2.6.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Insulinbindungs- und -wirkungsversuche erfolgte mittels eines T-Tests für paarige Stichproben (23).

3. Ergebnisse

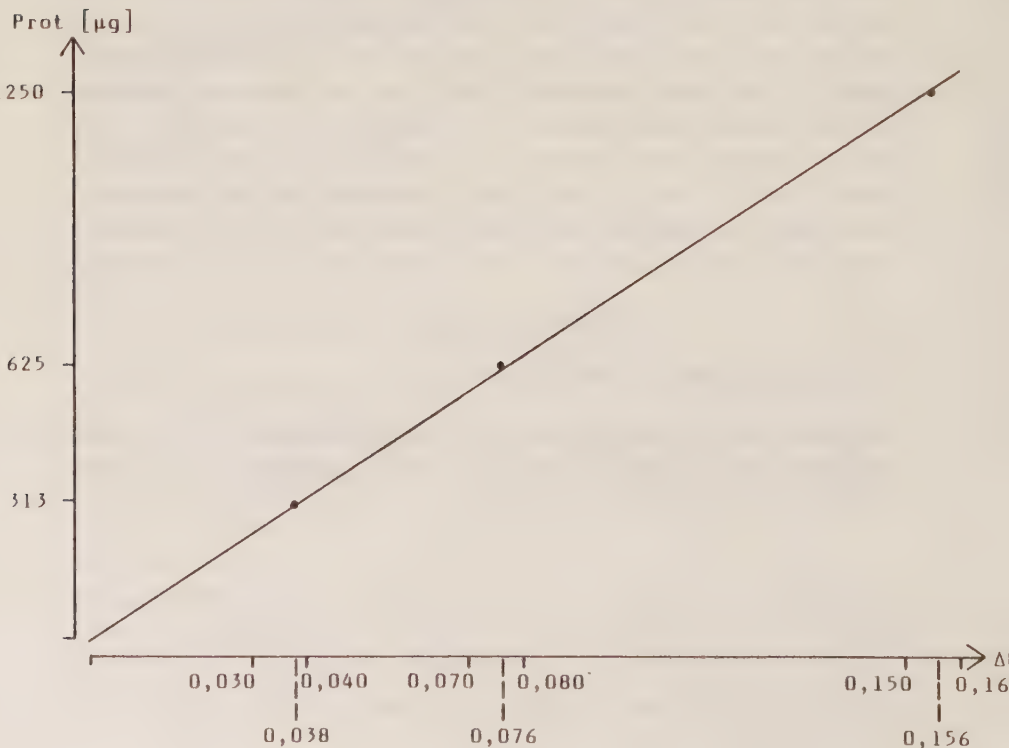
3.1 Proteinbestimmung (FAO-Hepatomazellen)

Die Proteinbestimmung wurde durchgeführt, um die Ergebnisse der Insulinbindungs- bzw. -wirkungsversuche auf mg Protein umrechnen zu können und um eine toxische Wirkung der VLDL auf die Zellen in Kultur, die sich in einem Abfall der Proteinmenge/Schale im Vergleich zu nicht mit Lipoproteinen inkubierten Zellen äußern würde, auszuschließen bzw. zu erkennen.

Aus den Ergebnissen einer an Protein-Standards durchgeführten Proteinbestimmung wurde eine Eichkurve erstellt (Abb. 3).

Abb. 3

Eichkurve für die Proteinbestimmung



Aus den Extinktionswerten $\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}$ und der Eichkurve wurde dann die Proteinmenge/Probe ermittelt.

Dabei gilt $\Delta E = E_{\text{vor KCN-Zugabe}} - E_{\text{nach KCN-Zugabe}}$.

In den Vorversuchen wurde zuerst die toxische Wirkung nicht dialysierter VLDL auf die Hepatomazellen untersucht. Ein wichtiges Ziel der Dialyse war es, eine eventuelle Zytotoxizität der VLDL durch Verhinderung der Oxydation bzw. Elimination der Oxydationsprodukte zu beseitigen (siehe 2.3.1).

Es ergaben sich folgende Werte für die Wirkung nicht dialysierter VLDL auf Protein von Hepatomazellen:

VLDL-IG-Konzentration im Kulturmedium 500 mg%, nichtdiabetische Human-VLDL

Protein/Schale
ohne Zugabe von VLDL
 $625 \pm 128 \mu\text{g}$

Protein/Schale
bei Zugabe von VLDL
 $517 \pm 96 \mu\text{g}$

(Angabe als Mittelwert $\pm$ SEM, Mittelwerte aus 5 Versuchen)

Die initiale Proteinmenge wurde auf Grund der standardisierten Aussaatbedingungen als gleich vorausgesetzt.

Diese deutliche toxische Wirkung machte eine Dialyse nötig (die Werte sind im t-Test signifikant unterschiedlich).

Nach der Dialyse zeigte sich folgendes Ergebnis:

VLDL-IG-Konzentration im Kulturmedium 500 mg%

a) nichtdiabetische Human-VLDL

Protein/Schale
ohne Zugabe von VLDL
 $562 \pm 96 \mu\text{g}$

Protein/Schale
bei Zugabe von VLDL
 $575 \pm 60 \mu\text{g}$

b) diabetische Human-VLDL

Protein/Schale
ohne Zugabe von VLDL
 $677 \pm 118 \mu\text{g}$

Protein/Schale
bei Zugabe von VLDL
 $674 \pm 144 \mu\text{g}$

(Mittelwerte jeweils aus 3 Versuchen, Bestimmung als Doppelwerte)

Die aus dem Abfall der Proteinmenge/Schale erkennbare zytotoxische Wirkung der VLDL konnte offensichtlich durch die Dialyse eliminiert werden; im t-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe mehr.

3.2 Proteinbestimmung (HEP-G2-Zellen)

Die Berechnung der Proteinwerte erfolgte aus $\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerw.}}$ und der Eichkurve.

Da die Proben nur einen kleinen Teil des Gesamtproteins jeder Schale enthielten (60 μl bzw. 80 μl von 600 μl bzw. 400 μl Gesamt-Probevolumen) wurden die erhaltenen Proteinwerte anschließend noch auf Gesamtprotein/Schale umgerechnet. Es ergaben sich dabei die in Tab. 5 dargestellten Gesamtproteinmengen.

Auch hier war kein statistisch signifikanter Unterschied des Proteingehalts je Schale zwischen Zellen, die in Abwesenheit bzw. Gegenwart von Lipoproteinen inkubiert wurden, meßbar.

Tab. 5

Ergebnisse der Proteinbestimmung an HEP-G2-Zellen

Lipoprotein im Kulturmedium	n	Zelluläres Prot. [mg/Schale]
Kontrolle (ohne Lipoprot.)	75	$0,2904 \pm 0,046$
VLDL-TG 50 mg/100 ml	75	$0,2967 \pm 0,049$
VLDL-TG 500 mg/100 ml	75	$0,2804 \pm 0,043$
Kontrolle (ohne Lipoprot.)	30	$0,2370 \pm 0,076$
LDL-Protein 50 mg/100 ml	30	$0,2394 \pm 0,079$

Die Meßergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM angegeben; n ist die Anzahl der gemessenen Proben.

3.3 DNA-Bestimmung an FAO-Hepatomazellen

Zur weiteren Kontrolle einer nach der Dialyse noch verbliebenen möglichen zytotoxischen Wirkung der Lipoproteine bzw. der Inkubationsbedingungen wurden noch DNA-Bestimmungen durchgeführt.

Aus den Ergebnissen einer an Standards durchgeführten DNA-Bestimmung wurde eine Eichkurve erstellt; aus den Extinktionen der Proben und der Eichkurve wurde der DNA-Gehalt bestimmt.

Ergebnisse (normale Human-VLDL, VLDL-TG-Konz. im Kulturmedium 500 mg/100 ml)

DNA/Schale
ohne Zugabe von VLDL
3,25 μ g

DNA/Schale
bei Zugabe von VLDL
3,21 μ g

(Mittelwerte aus 2 Versuchen, Bestimmung als Dreifachwerte)

Auch die DNA-Bestimmung ergab also keinen Anhalt für eine Rest-Zytotoxizität nach der Dialyse.

3.4 Insulinbindung (FA0-Hepatomazellen)

3.4.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung

Nachdem in den Vorversuchen die Inkubationsbedingungen etabliert wurden, konnte die Insulinbindung studiert werden.

Die Versuchsansätze enthielten, neben dem Versuchsmedium und Mono-¹²⁵J-(TYR A14)-Insulin noch nichtradioaktives Insulin in Konzentrationen von 100 µU/ml, 1000 µU/ml und 100.000 µU/ml (Leerwert, beim Leerwert sollte eine maximale Verdrängung des radioaktiven Insulins von den Rezeptoren erfolgen, um nur die unspezifische Bindung zu erfassen).

Die spezifisch gebundenen cpm errechnen sich aus

$$\text{cpm}_{\text{Meßwert}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}$$

Auf weitere Konzentrationen an nichtradioaktivem Insulin, die zur Erstellung eines Scatchard-Plots notwendig gewesen wären, wurde wegen des hohen Aufwands bei der Präparation der notwendigen VLDL verzichtet (dies gilt besonders für die diabetischen Human-VLDL, in noch stärkerem Maße für Ratten-VLDL).

Die durchschnittliche Triglycerid-Konzentration nach der Dialyse betrug bei normalen Human-VLDL 3624 mg/100 ml, es mußten also 13,8 % vom Gesamtvolumen des Kulturmediums an VLDL bzw. physiologischer Kochsalzlösung in die Zellkultur eingesetzt werden, um die gewünschte Endkonzentration von 500 mg/100 ml VLDL-TG zu erreichen.

Bei der Auswertung mußte die durchschnittliche Konzentration an biologisch aktivem Tracer-Insulin zur jeweiligen Konzentration des nichtradioaktiven Insulins addiert werden. Da die biologische Aktivität des Tracer-Insulins als Folge des radioaktiven Zerfalls im Laufe der Zeit abnimmt, mußte sie jeweils mit Hilfe einer Zerfallstabelle ermittelt werden.

Für die Insulinbindung nach Vorinkubation mit normalen Human-VLDL bzw. physiologischer Kochsalzlösung ergaben sich folgende Werte (Tab. 6):

Tab. 6

Insulinbindung nach Vorinkubation mit normalen Human-VLDL
(VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

eingesetztes Insulin	geb. Insulin abs./mg Prot.	in %
a) Inkubation ohne VLDL		
nur Tracer (4,44 µU)	$0,111 \pm 0,033 \mu\text{U}$	2,50
104,44 µU	$1,848 \pm 0,707 \mu\text{U}$	1,77
1004,44 µU	$10,881 \pm 4,804 \mu\text{U}$	1,08
b) Inkubation mit VLDL		
nur Tracer (4,44 µU)	$0,108 \pm 0,039 \mu\text{U}$	2,43
104,44 µU	$1,848 \pm 0,814 \mu\text{U}$	1,77
1004,44 µU	$12,420 \pm 4,779 \mu\text{U}$	1,24

Alle Ergebnisse Insulin gebunden/mg Protein $\pm$ SEM; Bestimmung als Doppelwerte; Anzahl der Versuche n = 4

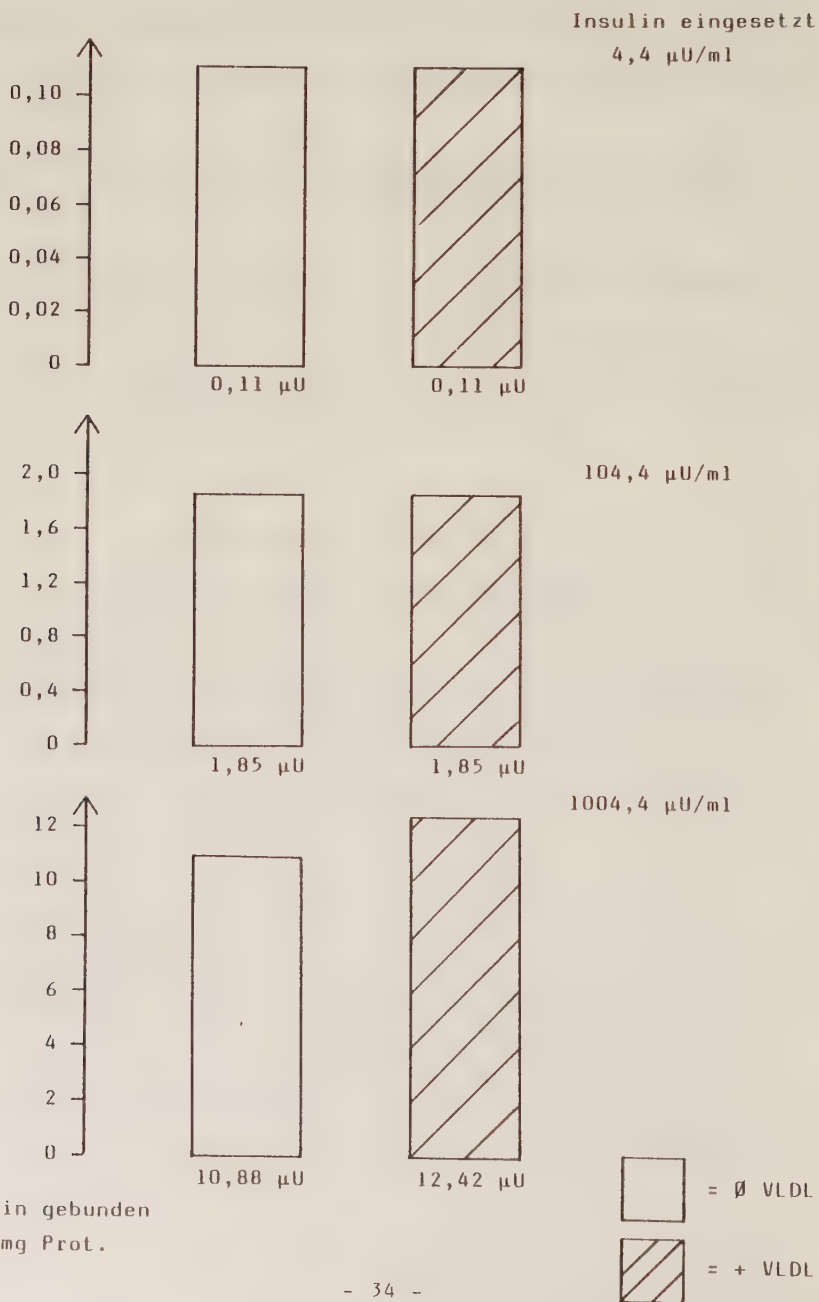
Zur weiteren Veranschaulichung der Ergebnisse sind diese noch im nachfolgenden Blockdiagramm dargestellt (Abb. 4)

Wie aus Tab. 6 und Abb. 4 ersichtlich, war kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und Zellen, die in Gegenwart von VLDL inkubiert wurden, d.h. kein Effekt der VLDL auf die Insulinrezeptorbindung, nachweisbar.

Im statistischen Test (t-Test) konnte die Nullhypothese (Die Insulinrezeptorbindung an beiden Gruppen ist gleich) nicht verworfen werden.

Abb. 4

Insulinbindung nach Inkubation mit normalen Human-VLDL
(FAO-Hepatomaellen)



3.4.2 Einfluß von diabetischen Human-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung

Die Auswertung der Versuchsergebnisse bei der Insulinbindungsmessung nach Inkubation mit diabetischen Human-VLDL erfolgte wie in Absatz 3.4.1 beschrieben.

Die durchschnittliche VLDL-TG-Konzentration nach der Dialyse betrug hier 3410 mg%, so daß im Durchschnitt 14,66 % Volumen an VLDL-Lösung bzw. NaCl 0,9 % in den Inkubationsansatz eingebracht werden mußte.

Es ergaben sich folgende Werte (Tab. 7 und Abb. 5):

Tab. 7

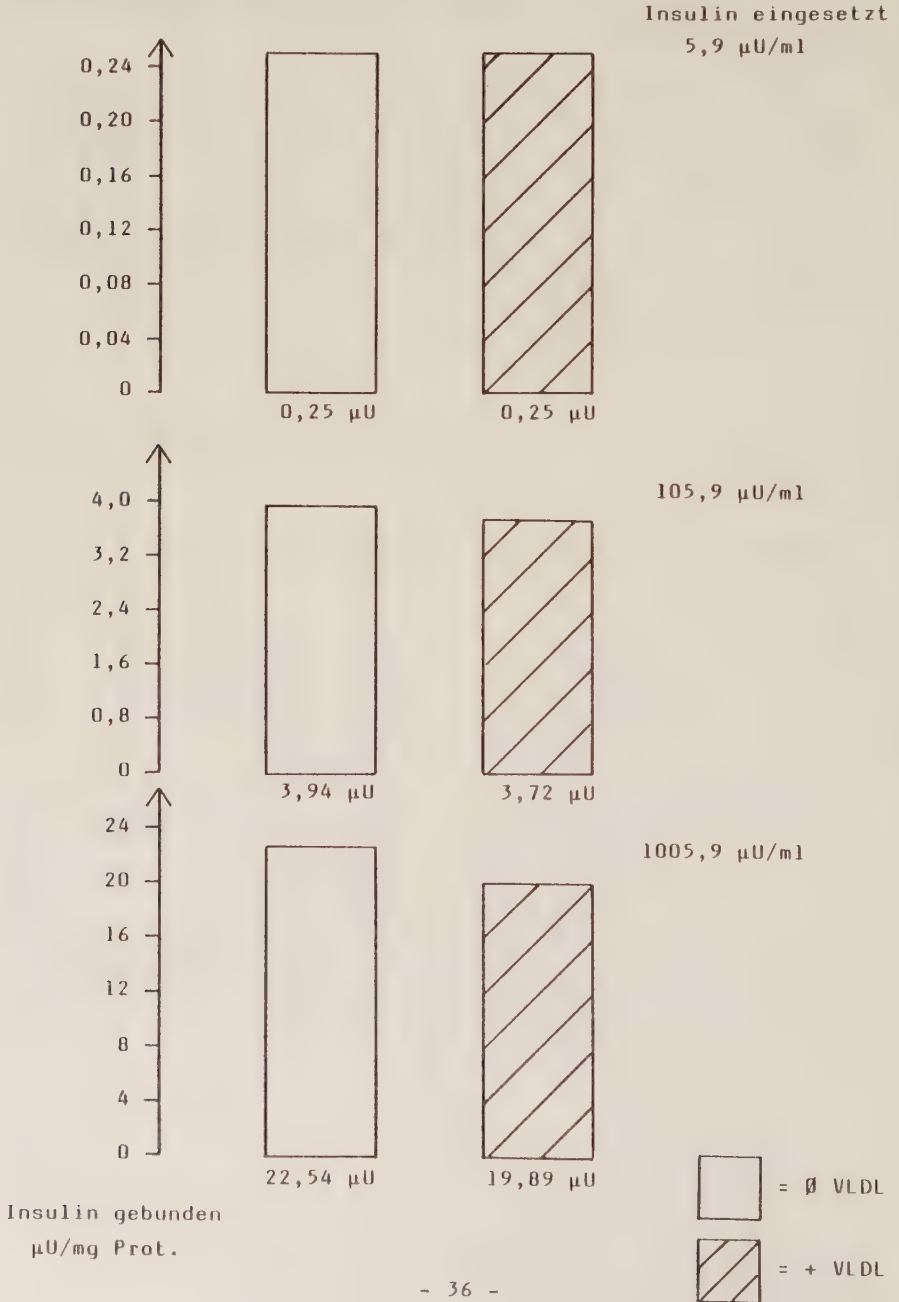
Insulinbindung nach Inkubation mit diabetischen Human-VLDL (VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

eingesetztes Insulin		geb. Insulin abs./mg Prot.	in %
a) Inkubation ohne VLDL			
nur Tracer	(5,88 µU)	$0,253 \pm 0,113$ µU	4,30
	105,88 µU	$3,935 \pm 1,663$ µU	3,72
	1005,88 µU	$22,537 \pm 10,681$ µU	2,24
b) Inkubation mit VLDL			
nur Tracer	(5,88 µU)	$0,248 \pm 0,891$ µU	4,22
	105,88 µU	$3,723 \pm 1,450$ µU	3,52
	1005,88 µU	$19,894 \pm 7,268$ µU	1,98

Alle Ergebnisse Insulin gebunden/mg Protein $\pm$ SEM; Bestimmung als Doppelwerte; Anzahl der Versuche n = 4

Abb. 5

Insulinbindung nach Inkubation mit diabetischen Human-VLDL
(FAO-Hepatomaellen)



Auch bei Verwendung von diabetischen Human-VLDL ist kein Unterschied in der Insulinrezeptorbindung zwischen mit VLDL inkubierten Zellen und der Kontrollgruppe erkennbar.

Die statistische Auswertung (t-Test) ergab, daß die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe) nicht verworfen werden kann.

3.4.3 Einfluß von diabetischen Ratten-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung

Die Auswertung der Ergebnisse der Insulinbindungsbestimmung nach Inkubation mit VLDL aus dem Blut Streptozotocin-diabetischer Ratten erfolgte analog zu 3.4.1.

Die durchschnittliche VLDL-TG-Konzentration nach der Dialyse betrug 2214 mg%, es mußten also im Durchschnitt 22,58 % VLDL-Lösung bzw. NaCl 0,9 % eingesetzt werden. Ursache für diese niedrigere Konzentration ist der im Vergleich zum Menschen geringere Gehalt an VLDL-TG im Rattenblut (TG-Gesamtkonzentration im Serum nichtdiabetischer Ratten 52 mg/100 ml; Mittelwert aus 3 Bestimmungen; TG-Gesamtkonzentration im Serum Streptozotocin-diabetischer Ratten 93 mg%; Mittelwert aus 3 Bestimmungen). Da zur Vermeidung von Gerinnung während der Abnahme Citratblut abgenommen werden mußte, kam es zu einer weiteren Verdünnung um ca. 10 %; das Citrat wurde als niedermolekulare Substanz bei der Dialyse entfernt.

Die durchschnittliche Blutmenge, die bei den Ratten (Körpergewicht 200 - 300 g) entnommen werden konnte, war etwa 12 ml; für jede Lipoprotein-Präparation wurde also Blut von 20 - 25 Tieren verwendet.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind aus Tab. 8 und Abb. 6 ersichtlich.

Tab. 8

Insulinbindung nach Inkubation mit diabetischen Ratten-VLDL
(VLDL-IG-Konz. 500 mg/100 ml)

eingesetztes Insulin	geb. Insulin abs./mg Prot.	in %
a) Inkubation ohne VLDL		
nur Tracer (6,08 μ U)	0,219 $\pm$ 0,040 μ U	3,60
106,08 μ U	3,111 $\pm$ 0,621 μ U	2,93
1006,08 μ U	18,837 $\pm$ 4,080 μ U	1,87
b) Inkubation mit VLDL		
nur Tracer (6,08 μ U)	0,233 $\pm$ 0,061 μ U	3,83
106,08 μ U	3,335 $\pm$ 0,650 μ U	3,14
1006,08 μ U	20,646 $\pm$ 1,367 μ U	2,05

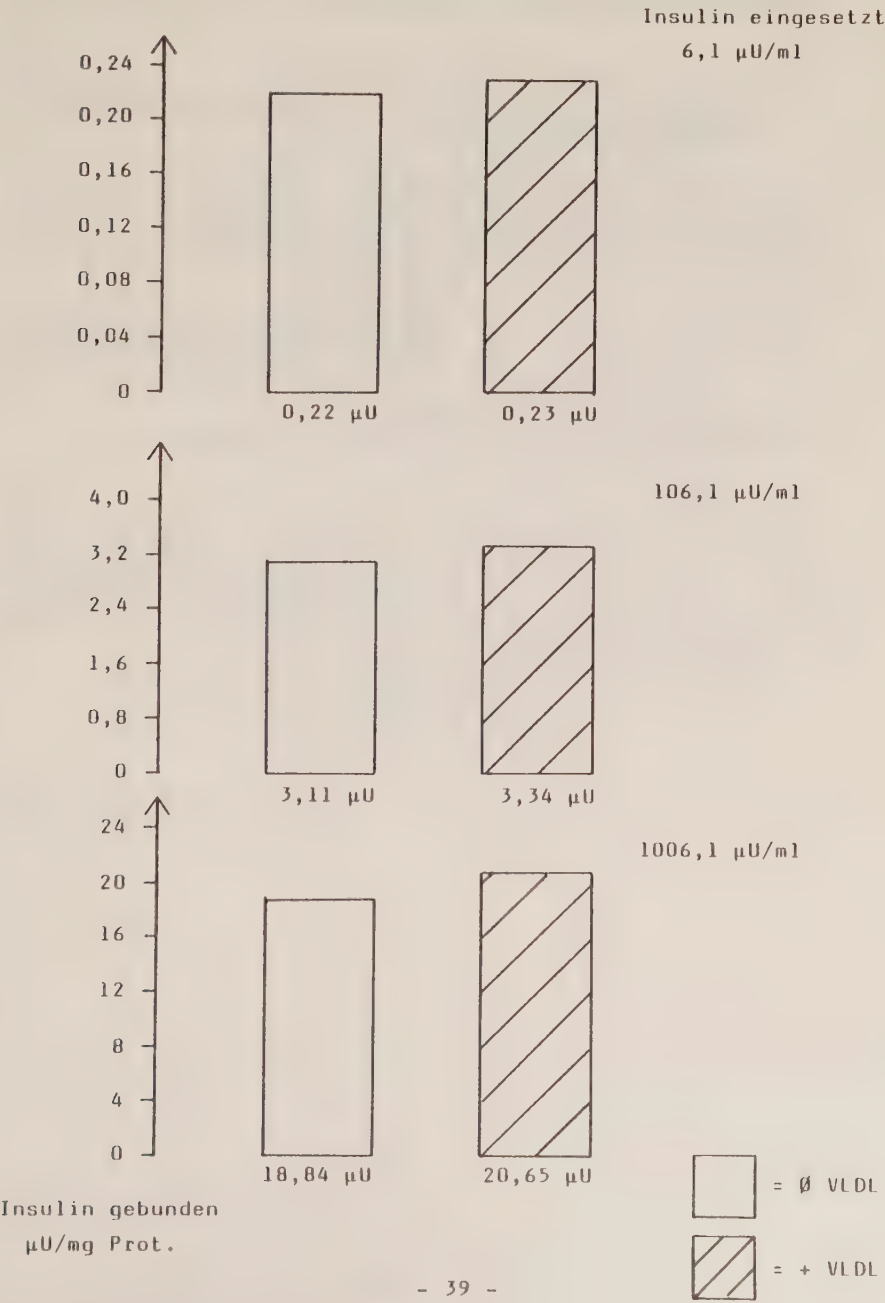
Alle Ergebnisse Insulin gebunden/mg Protein $\pm$ SEM; Bestimmung
als Doppelwerte; Anzahl der Versuche n = 3

Auch nach Inkubation mit VLDL von Streptozotocin-diabetischen
Ratten, also im homologen System, zeigte sich keine Veränderung
der Insulinrezeptorbindung.

Die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Versuchs- und
Kontrollgruppe) konnte im t-Test nicht verworfen werden.

Abb. 6

Insulinbindung nach Inkubation mit diabetischen Ratten-VLDL
(FAO-Hepatomazellen)



3.5 Insulinbindung (HEP-G2-Zellen)

3.5.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die Insulinrezeptorbindung an HEP-G2-Zellen

Die Auswertung der Ergebnisse der Insulinbindungsversuche mit HEP-G2-Zellen erfolgte analog zu 3.4.1; zusätzlich mußte noch das von jeder Probe zur Proteinbestimmung abgezweigte Volumen in der Berechnung berücksichtigt werden.

Die Bestimmung erfolgte für VLDL-IG-Konzentrationen von 50 mg/100 ml (physiologisch), 500 mg/100 ml (pathologisch) und eine Kontrollgruppe ohne VLDL-Zugabe.

Die Ergebnisse sind in Tab. 9 und Abb. 7 dargestellt.

Da nur verhältnismäßig leicht zu gewinnende normale Human-VLDL verwendet wurden, konnte ein zusätzlicher Wert (10.000 μ U/ml) bestimmt werden; damit war die Erstellung eines Scatchard-Plots möglich. Alle Werte sind zur Vereinfachung als % der eingesetzten Gesamtaktivität berechnet.

Tab. 9

Insulinbindung nach Inkubation der HEP-G2-Zellen mit normalen Human-VLDL

a) Inkubation ohne VLDL

Tracer allein	2,605 %	$\pm$ 0,420 %
Tracer + 100 μ U/ml	1,170 %	$\pm$ 0,320 %
Tracer + 1000 μ U/ml	0,450 %	$\pm$ 0,157 %
Tracer + 10000 μ U/ml	0,298 %	$\pm$ 0,101 %

b) Inkubation mit VLDL

(VLDL-IG-Konz. 50 mg/100 ml)

Tracer allein	2,640 %	$\pm$ 1,058 %
Tracer + 100 μ U/ml	1,495 %	$\pm$ 0,707 %
Tracer + 1000 μ U/ml	0,653 %	$\pm$ 0,296 %
Tracer + 10000 μ U/ml	0,365 %	$\pm$ 0,082 %

c) Inkubation mit VLDL

(VLDL-IG-Konz. 500 mg/100 ml)

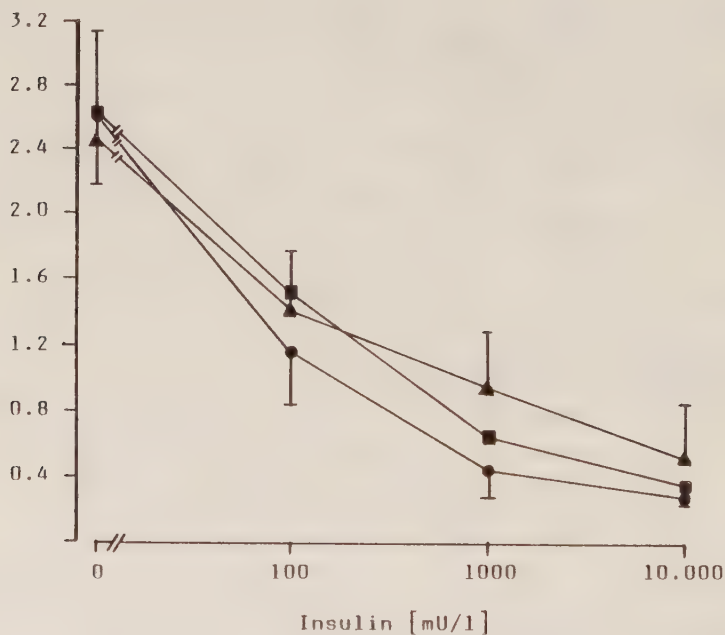
Tracer allein	2,470 %	$\pm$ 0,670 %
Tracer + 100 μ U/ml	1,419 %	$\pm$ 0,332 %
Tracer + 1000 μ U/ml	0,960 %	$\pm$ 0,350 %
Tracer + 10000 μ U/ml	0,532 %	$\pm$ 0,033 %

Alle Werte Insulin gebunden / Insulin eingesetzt (in %) $\pm$ SEM;
Bestimmung als Doppelwerte; Anzahl der Versuche n = 3

Abb. 7

Insulinbindung nach Inkubation der HEP-G2-Zellen mit normalen Human-VLDL

Insulin gebunden
[%/mg Prot.]



- — ● Inkubation ohne VLDL
- — ■ Inkubation mit 50 mg% VLDL-TG
- ▲ — ▲ Inkubation mit 500 mg% VLDL-TG

3.5.2 Einfluß von normalen Human-LDL auf die Insulinrezeptor- bindung an HEP-G2-Zellen

Die Auswertung dieser Versuchsreihe (Inkubation mit LDL der Konzentration 50 mg/100 ml LDL-Protein bzw. NaCl 0,9 %) erfolgte analog zu 3.5.1.

Die Ergebnisse lauten (Tab. 10 und Abb. 8):

Tab. 10

Insulinbindung nach Inkubation der HEP-G2-Zellen mit normalen Human-LDL

a) Inkubation ohne LDL

Tracer allein	2,610 % $\pm$ 0,610 %
Tracer + 100 μ U/ml	1,120 % $\pm$ 0,420 %
Tracer + 1000 μ U/ml	0,420 % $\pm$ 0,210 %
Tracer + 10000 μ U/ml	0,295 % $\pm$ 0,186 %

b) Inkubation mit LDL

(LDL-Protein-Konz. 50 mg/100 ml)

Tracer allein	2,627 % $\pm$ 0,694 %
Tracer + 100 μ U/ml	1,099 % $\pm$ 0,522 %
Tracer + 1000 μ U/ml	0,590 % $\pm$ 0,246 %
Tracer + 10000 μ U/ml	0,383 % $\pm$ 0,192 %

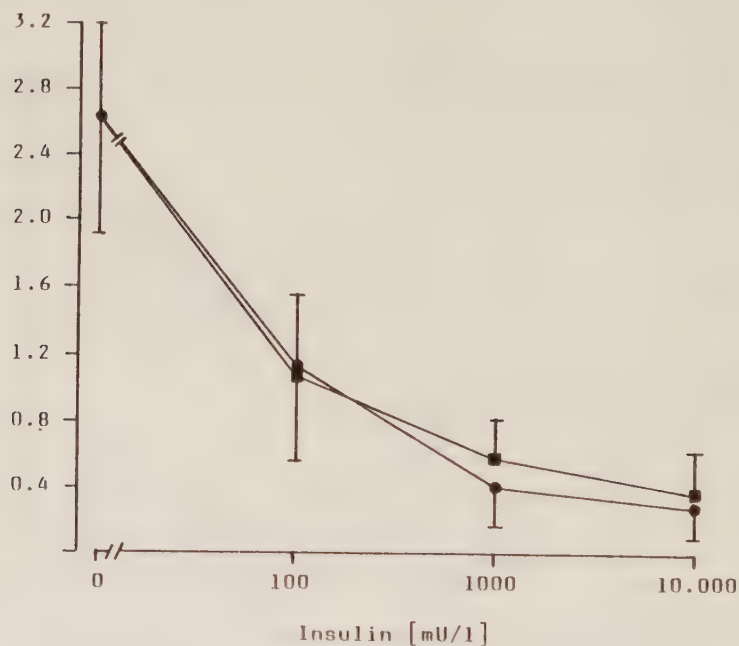
Alle Werte Insulin gebunden / Insulin eingesetzt (in %) $\pm$ SEM;
Bestimmung als Doppelwerte; Anzahl der Versuche n = 3

Abb. 8

Insulinbindung nach Inkubation der HEP-G2-Zellen mit normalen Human-LDL

Insulin gebunden

[%/mg Prot.]



● — ● Inkubation ohne LDL
■ — ■ Inkubation mit LDL

3.6 Insulinwirkung (FAO-Hepatomazellen)

3.6.1 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die Insulinwirkung

Als Parameter der Insulinwirkung wurde die Glykogensynthese aus ^{14}C -Glucose mit und ohne Stimulation durch Insulin gemessen.

Die pro mg Protein in Glykogen eingebaute Glucose wurde nach der Formel

$$\frac{\text{cpm}_{\text{eingebaut}}}{\text{cpm}_{\text{eingesetzt}}} \times [\text{Glucose}_{\text{insgesamt}}] = \frac{\text{Glucose}_{\text{eingebaut}}}{\text{mg Protein}} \text{ /mg Prot.}$$

errechnet; dabei ist $\text{cpm}_{\text{eingebaut}} = \text{cpm}_{\text{gemessen}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}$.
Da die Konzentration an radioaktiver Glucose (0,44 nmol/ml) im Vergleich zur Konzentration der nichtradioaktiven Glucose (2,5 mM) verschwindend gering ist, wurde sie vernachlässigt.

Tab. 11 und Abb. 9 zeigen die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

Tab. 11

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit normalen Human-VLDL

a) Inkubation ohne VLDL

Basal: $1,820 \pm 0,452$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $3,971 \pm 0,382$ nmol/mg Prot.

b) Inkubation mit VLDL

(VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

Basal: $1,609 \pm 0,396$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $4,032 \pm 0,645$ nmol/mg Prot.

Alle Werte Glucoseeinbau $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche n = 5;
Bestimmung als Dreifachwerte

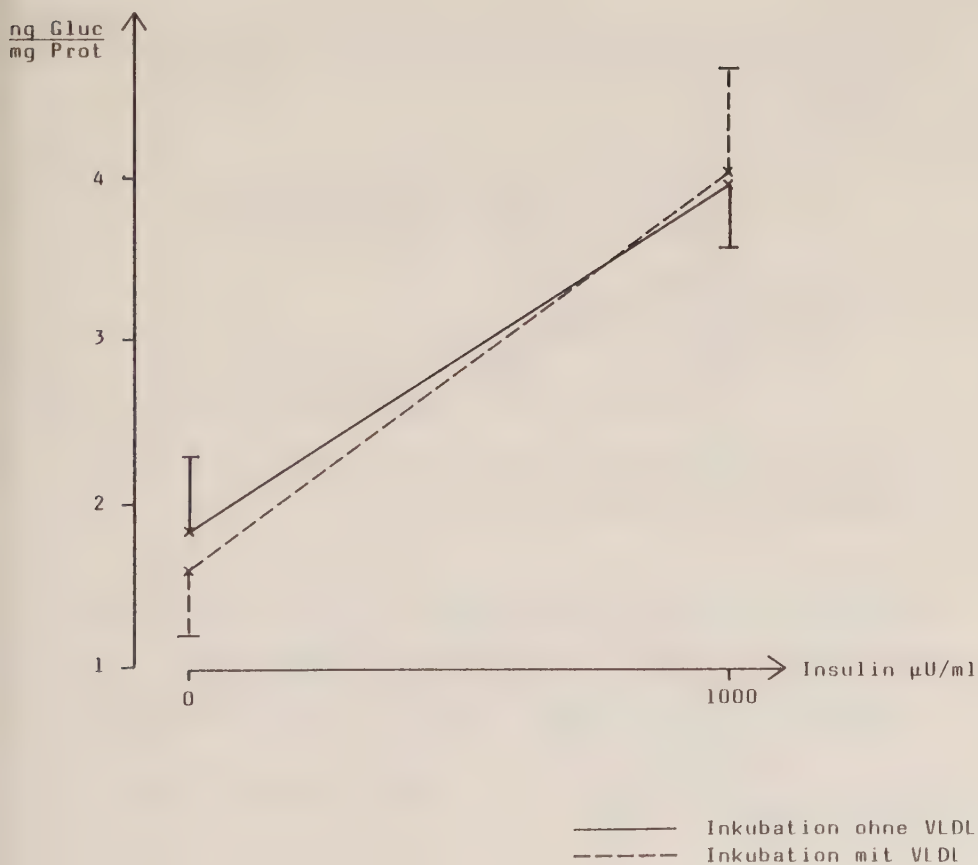
Ein Unterschied in der Insulinwirkung zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe, also ein Postrezeptoreffekt der Lipoproteine, ist nicht nachweisbar; die basale und insulinstimulierte Glykogensynthese war unverändert.

Im t-Test konnte die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Lipid- und Kontrollgruppe) nicht verworfen werden.

Abb. 9

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit normalen Human-VLDL

Glucose eingebaut



3.6.2 Einfluß von diabetischen Human-VLDL auf die Insulinwirkung

Die Ergebnisse der Versuche zum Studium der Insulinwirkung nach Inkubation mit diabetischen Human-VLDL wurden wie in 3.6.1 beschrieben ausgewertet.

Es ergaben sich folgende Werte (Tab. 12):

Tab. 12

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit diabetischen Human-VLDL

a) Inkubation ohne VLDL

Basal: $1,904 \pm 0,707$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $3,493 \pm 1,491$ nmol/mg Prot.

b) Inkubation mit VLDL

(VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

Basal: $1,920 \pm 0,611$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $3,510 \pm 1,348$ nmol/mg Prot.

Alle Werte Glucoseeinbau $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche $n = 4$;
Bestimmung als Dreifachwerte

Auch hier ist kein Postrezeptoreffekt im Sinne einer Verringerung der Glykogensynthese durch VLDL nachweisbar.

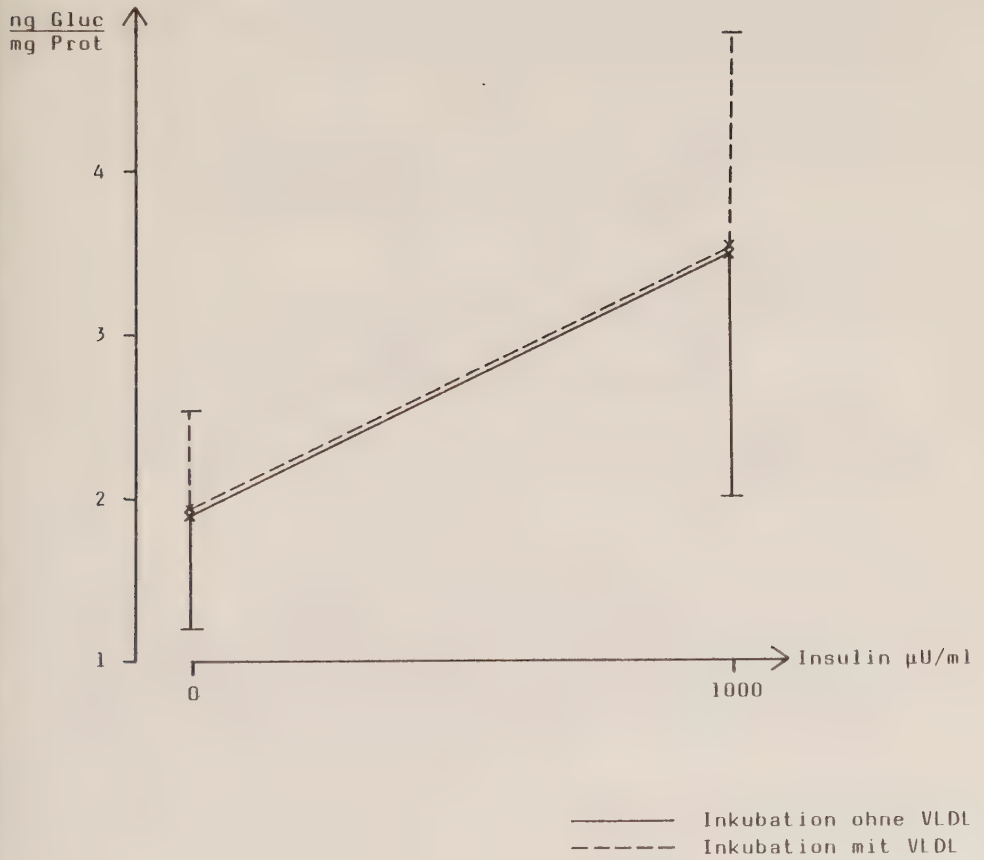
Die statistische Analyse im t-Test ergab, daß die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe) nicht verworfen werden kann.

In Abb. 10 sind diese Ergebnisse nochmals graphisch dargestellt.

Abb. 10

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit diabetischen
Human-VLDL

Glucose eingebaut



3.6.3 Einfluß von diabetischen Ratten-VLDL auf die Insulinwirkung

Die Auswertung dieser Versuchsreihe erfolgte wiederum analog zu 3.4.1. Es ergaben sich die in Tab. 13 und Abb. 11 dargestellten Ergebnisse.

Tab. 13

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit diabetischen Ratten-VLDL

a) Inkubation ohne VLDL

Basal: $2,182 \pm 0,182$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $3,923 \pm 0,483$ nmol/mg Prot.

b) Inkubation mit VLDL

(VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

Basal: $2,117 \pm 0,207$ nmol/mg Prot.

Stimuliert: $4,176 \pm 0,081$ nmol/mg Prot.

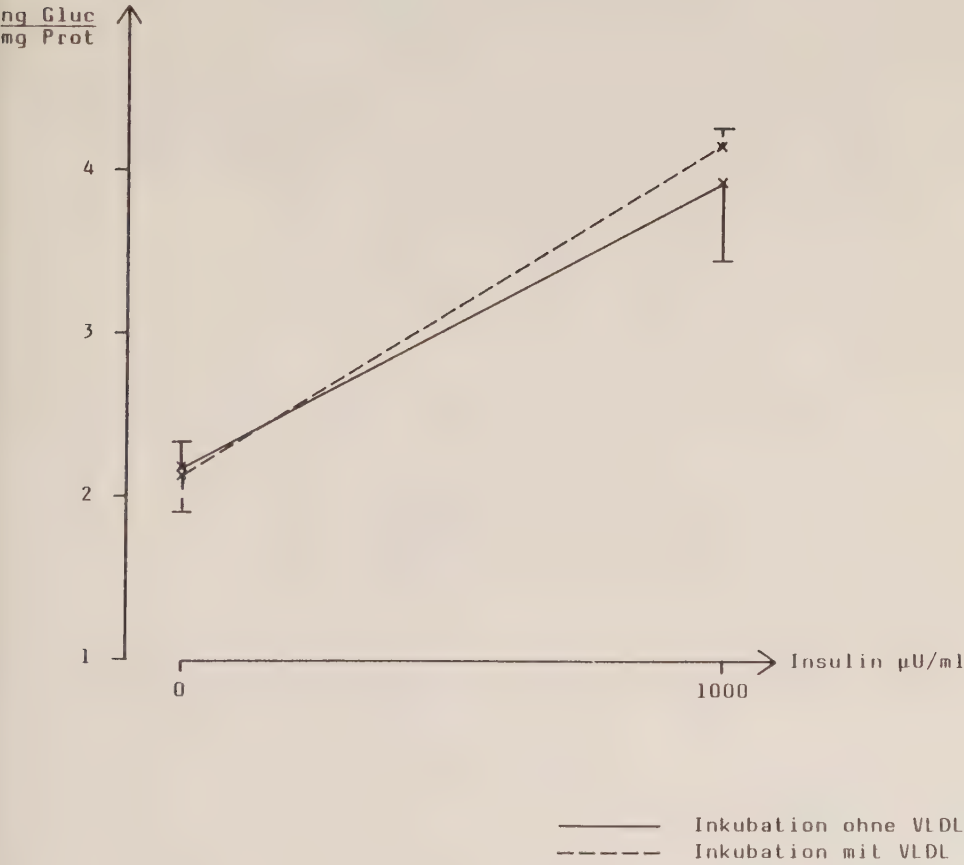
Glucoseeinbau $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche $n = 3$; Bestimmung als Dreifachwerte

Die Ergebnisse dieser Versuche lieferten ebenfalls keine Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Insulinwirkung an FAO-Hepatomazellen durch VLDL; auch nicht im homologen System. Im t-Test konnte die Nullhypothese (kein Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe) auch hier nicht verworfen werden.

Abb. 11

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation mit diabetischen Ratten-VLDL

Glucose eingebaut



3.7 Einfluß von normalen Human-VLDL auf die Insulinwirkung an HEP-G2-Zellen

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte wie in 3.6.1 dargestellt; es mußte noch die zur Proteinbestimmung entnommene Probenmenge berücksichtigt werden. Es ergaben sich die in Tab. 14 und Abb. 12 angegebenen Werte. Da hier mehrere insulin-stimulierte Meßwerte bestimmt wurden, sind alle Ergebnisse zur Vereinfachung in Prozent über basal angegeben.

Auch im System der HEP-G2-Zellen ergab sich damit kein statistisch signifikanter Unterschied in der Insulinwirkung zwischen mit VLDL in physiologischer und pathologischer Konzentration inkubierten Zellen und der Kontrollgruppe.

Tab. 14

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation der HEP-G2-Zellen
mit normalen Human-VLDL

a) Inkubation ohne VLDL

Basal	100	%		
Ins. 100 μ U/ml	111	% $\pm$	11,0	%
Ins. 1000 μ U/ml	135	% $\pm$	9,0	%
Ins. 10000 μ U/ml	143	% $\pm$	6,7	%
Ins. 100000 μ U/ml	152	% $\pm$	12,5	%

b) Inkubation mit VLDL

(VLDL-TG-Konz. 50 mg/100 ml)

Basal	100	%		
Ins. 100 μ U/ml	114	% $\pm$	14,4	%
Ins. 1000 μ U/ml	128	% $\pm$	7,7	%
Ins. 10000 μ U/ml	133	% $\pm$	5,1	%
Ins. 100000 μ U/ml	148	% $\pm$	6,7	%

c) Inkubation mit VLDL

(VLDL-TG-Konz. 500 mg/100 ml)

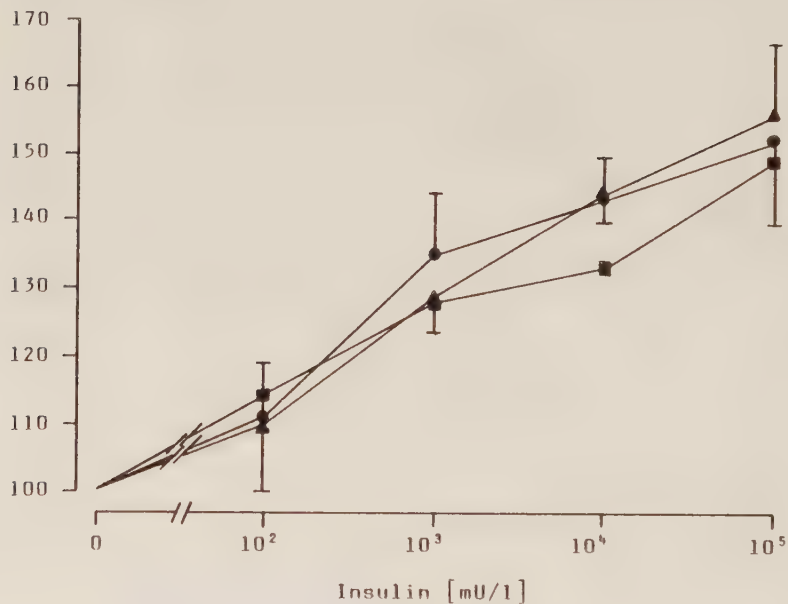
Basal	100	%		
Ins. 100 μ U/ml	110	% $\pm$	9,3	%
Ins. 1000 μ U/ml	129	% $\pm$	6,3	%
Ins. 10000 μ U/ml	144	% $\pm$	3,8	%
Ins. 100000 μ U/ml	156	% $\pm$	11,6	%

Alle Ergebnisse Glucoseeinbau $\pm$ SEM; Anzahl der Versuche n = 3;
Bestimmung als Dreifachwerte

Abb. 12

Glucoseeinbau in Glykogen nach Inkubation der HEP-G2-Zellen
mit normalen Human-VLDL

Glykogensynthese
[% über basal]



- — ● Inkubation ohne VLDL
- — ■ Inkubation mit 50 mg% VLDL-TG
- ▲ — ▲ Inkubation mit 500 mg% VLDL-TG

4. Diskussion

4.1 Ausgangssituation in der Literatur

Der Einfluß verschiedener Lipoproteine auf Parameter der Insulinbindung und -wirkung wurde bereits im Rahmen mehrerer Studien, sowohl in vivo als auch in vitro, untersucht.

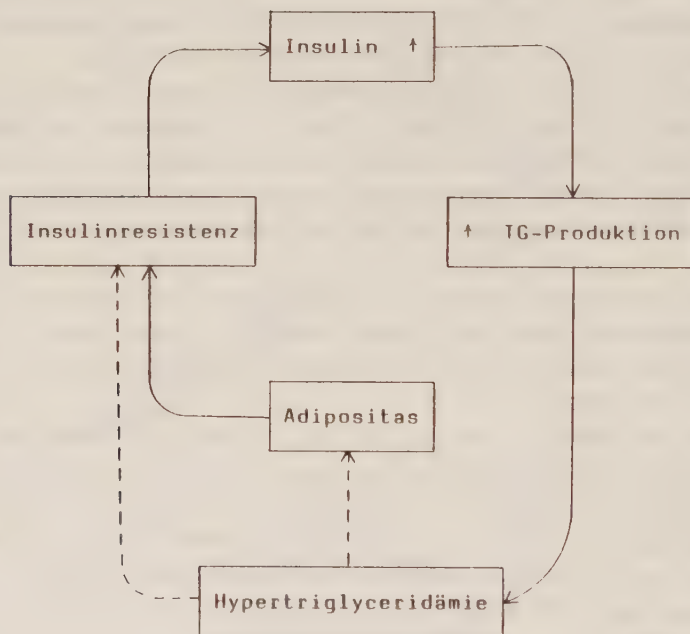
Eaton et al. (11) konnten gleichsinnig erhöhte Insulin- und Triglyceridkonzentrationen im Blut von Patienten mit endogener Hyperlipidämie nachweisen, während Steiner et al. (36) mittels Glucose-Kinetik-Studien an schlanken Patienten mit endogener Hypertriglyceridämie eine Insulinresistenz beobachteten.

Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß erhöhte VLDL-Triglyceridspiegel Teil eines Circulus vitiosus seien (37), der eine Induktion bzw. Verstärkung der Insulinresistenz zur Folge habe (Abb. 13).

Grundlage dieser Hypothese war die Annahme, daß hohe Konzentrationen an VLDL die Insulinrezeptorkapazität "herunterregulieren" können. Diese Verminderung (Downregulation) müßte zur Hyperinsulinämie führen. Da Hyperinsulinämie zu einer erhöhten Produktion an VLDL-Triglycerid durch die Leber (30,40) sowie reduziertem VLDL-Abbau bei verminderter Lipoproteinlipaseaktivität (10) führt, erhöht sich der Triglyceridspiegel weiter. Der Circulus vitiosus der Insulinresistenz wäre damit geschlossen.

Abb. 13

Hypothetischer Circulus vitiosus der Insulinresistenz (nach Steiner et al.)



———— bewiesene Zusammenhänge

----- hypothetische Zusammenhänge

Die oben erwähnten Studien in vivo wurden in ihrer Aussage gestützt durch in-vitro-Untersuchungen an IM-9-Lymphozyten in Kultur. Nach 24 Stunden Inkubation mit VLDL war die Insulinbindung gegenüber Kontrollzellen vermindert, nicht dagegen nach 45 min Inkubation mit VLDL oder nach Inkubation mit reinen Triglyceriden (Intralipid®) (36).

An den IM-9-Lymphozyten wurde kein Parameter der Insulinwirkung gemessen; außerdem sind Lymphozyten sicher nicht als wichtiges Zielgewebe des Insulins zu betrachten; die metabolische Bedeutung dieser Ergebnisse ist also unklar.

Eine weitere Möglichkeit für die Induktion einer Insulinresistenz läge auf der Postrezeptorebene. So fand sich an Aortenendothelzellen von Rindern in Kultur, die mit Malondialdehyd-behandelten LDL (MDA-LDL) oder β -VLDL (stark hypercholesterinämischen VLDL) 3 Tage lang inkubiert worden waren, nicht jedoch bei mit normalen LDL behandelten Zellen, eine verminderte Stimulierbarkeit der Aminosäureaufnahme (AIB-uptake) durch Insulin. Dabei war die Insulinrezeptorzahl und -affinität nicht verändert gegenüber der Kontrollgruppe (3). Die Autoren führten diese Postrezeptor-Insulinresistenz auf eine Erhöhung des Cholesteringehalts der Zellen durch die Lipoproteine und daraus resultierende Membranveränderungen (evtl. an den Transportmolekülen) zurück. Im Rahmen dieser Studie wurden jedoch keine normalen VLDL verwendet, außerdem wurde auch hier nicht die Leber als entscheidendes Zielorgan des Insulins untersucht.

4.2 Eigene Ergebnisse

4.2.1 Insulinbindung

In der vorliegenden Studie konnte kein Einfluß der verschiedenen VLDL (aus dem Blut nichtdiabetischer und diabetischer Patienten sowie von Ratten) auf die Insulinrezeptorkapazität und -affinität sowohl an FAO-Hepatomazellen wie auch an HEP-G2-Zellen festgestellt werden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Steiner et al. (37), die an IM-9-Lymphozyten und später auch an Adipozyten der Ratte in Kultur einen solchen Effekt beobachten konnte. Dieser Widerspruch ließe sich einerseits dadurch erklären, daß die Wirkung der Inkubation mit VLDL auf Leberzellen anders als auf Lympho- bzw. Adipozyten wäre. Da die Leber aber das zentrale Organ des Kohlenhydratstoffwechsels darstellt, wäre der metabolische Effekt einer Insulinresistenz, die dort nicht nachgewiesen werden kann, für den Gesamtorganismus wohl eher als wenig bedeutsam anzusehen. Weiterhin geht aus der Literatur nicht hervor, inwieweit bei den Untersuchungen an den Lympho- und Adipozyten ein eventueller toxischer Einfluß der Lipoproteine auf die untersuchten Zellen ausgeschlossen wurde. Nicht dialysierte VLDL hatten im Rahmen unserer Untersuchungen eine erhebliche zytotoxische Wirkung, die sich außer in einem Abfall der Proteinmenge gegenüber Kontrollzellen auch in einem deutlichen Abfall der Insulinbindung zeigte. Eine größere Sensibilität der IM-9-Lymphozyten und der Adipozyten gegenüber toxischen Lipoproteinwirkungen wäre ebenfalls denkbar.

Im Einklang mit den vorliegenden Resultaten stehen hier dagegen die Ergebnisse von Berliner et al. (3), die an Aortenendothelzellen in Kultur keine Änderung der Insulinbindungsparameter nach Inkubation mit verschiedenen Lipoproteinen (normale LDL, Malondialdehyd-modifizierte LDL, β -VLDL) feststellen konnten. Durch LDL in physiologischer Konzentration konnte ebenfalls in unseren Versuchen keine Insulinresistenz induziert

werden. Dies legt den Schluß nahe, daß Interaktion zwischen LDL und ihrem Rezeptor (9) die Interaktion zwischen Insulin und seinem Rezeptor unbeeinflußt läßt (diese Versuche wurden an HEP-G2-Zellen durchgeführt).

VLDL von hypertriglyceridämischen Typ II-Diabetikern wurden in unserer Studie, wegen ihrer gegenüber normalen VLDL veränderten Zusammensetzung, gesondert untersucht. So wurde z.B. in VLDL aus dem Blut diabetischer Versuchspersonen ein höherer Anteil von Cholesterol und Apolipoprotein E gefunden. Im Blut von Typ II-Diabetikern ist der Anteil der cholesterinreichen β -VLDL erhöht (39); weiterhin ist der Anteil der IDL-Fraktion (Lipoproteine der Dichte $d = 1,006 - 1,019$ g/ml) im Blut vieler Diabetiker erhöht (24), was wohl auf einen Anstieg der "Remnants" beim Abbau triglyceridreicher Lipoproteine hindeutet. Trotz dieser Unterschiede war jedoch auch hier kein Einfluß der Inkubation mit VLDL auf die Insulinbindung meßbar. Unsere Ergebnisse stehen also auch hier im Einklang mit denen der Arbeitsgruppe von Berliner et al. (3).

Nach diesen Versuchen mit FAO-Hepatomazellen, die in einem heterologen System durchgeführt worden waren, konnte ein etwaiger Einfluß der VLDL auf die Insulinbindungsparameter, der sich lediglich im homologen System manifestieren würde, noch nicht ausgeschlossen werden. Eine solche Wirkung nur im homologen System hätte auch den Widerspruch zu den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Steiner et al. erklärt, denen mit den IM-9-Lymphozyten und humanen Lipoproteinen ein solches homologes System zur Verfügung stand. Deshalb verwendeten wir in weiteren Versuchsreihen VLDL aus dem Blut streptozotocin-diabetischer Ratten und bildeten damit mit den FAO-Hepatomazellen ebenso ein homologes System wie auch mit HEP-G2-Zellen und humanen VLDL bzw. LDL. Auch hier konnten wir jedoch keine Änderung der Insulinrezeptorkapazität bzw. -affinität beobachten. Der Unterschied homologes/heterologes System ist also für das Fehlen einer Lipoprotein-induzierten Insulinresistenz auf Rezeptorebene nicht verantwortlich.

Da nach den bisherigen Ergebnissen eine Insulinresistenz auf der Ebene des Rezeptors durch Lipoproteine nur an Lympho- und

Adipozyten nachgewiesen werden konnte, an der Leber und an Aortenendothelzellen aber nicht hervorgerufen werden konnte, ist ihre Bedeutung für den Kohlenhydratstoffwechsel wohl gering einzuschätzen.

4.2.2 Insulinwirkung

Die basale Glykogensynthese aus ^{14}C -Glucose bzw. ^3H -Glucose und ihre Stimulierbarkeit durch Insulin waren bei 24 Stunden mit VLDL aus dem Blut gesunder Personen inkubierten Zellen unverändert gegenüber Kontrollzellen; ebenso nach der Inkubation der FAO-Hepatomazellen mit VLDL aus dem Blut nicht insulinpflichtiger Diabetiker bzw. solchen aus dem Blut Streptozotocin-diabetischer Ratten. Eine Insulinresistenz durch VLDL auf Postrezeptorebene konnte aber in unseren Versuchen nicht induziert werden. Im Gegensatz dazu fanden Berliner et al. (3) eine verminderte Stimulierbarkeit der AIB-Aufnahme nach 72 Stunden Inkubation mit β -VLDL oder MDA-LDL. Für diese unterschiedlichen Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

- 1) Die Diskrepanz zwischen den Beobachtungen an Leber- und Aortenendothelzellen ist Folge einer Gewebespezifität des Lipoprotein-Effektes. Da die Leber aber für die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase ungleich wichtiger ist als das Gefäßendothel, wäre die Bedeutung eines erhöhten Triglyceridspiegels für die Induktion oder Verstärkung einer Insulinresistenz dann wohl sehr gering.
- 2) β -VLDL haben eine gegenüber normalen VLDL deutlich veränderte Zusammensetzung; so ist insbesondere ihr Cholesteringehalt deutlich höher. Es ist denkbar, daß β -VLDL den zellulären Cholesteringehalt erhöhen und dadurch Insulinresistenz induzieren. Dafür spräche auch die Beobachtung, daß MDA-LDL ebenfalls eine Postrezeptor-Insulinresistenz induzieren, nicht aber normale LDL, deren Aufnahme durch den LDL-Rezeptor

einer Feedback-Regulation unterliegt, die die Zellen vor einer Überladung mit Cholesterin schützt. VLDL (außer β -VLDL) werden im Gefäßsystem metabolisiert und können keine Erhöhung des zellulären Cholesteringehalts induzieren. Diese Unterschiede zwischen den verschiedenen Lipoproteinen bzw. ihren Abbauwegen könnten die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

- 3) Die AIB-Aufnahme ist ein membranabhängiger Prozeß. Eine veränderte Membranzusammensetzung durch cholesterinreiche β -VLDL bzw. MDA-LDL könnte sich auf den Aminosäuretransport durch die Zellmembran auswirken, dabei aber die Aktivität der Glykogensynthetase unbeeinflußt lassen. Die Bedeutung einer solchen isolierten Beeinflussung membranabhängiger Transportvorgänge für die Herabsetzung der Glucosetoleranz beim Typ II-Diabetes wäre fraglich. Der Lipoprotein-Effekt wäre damit lediglich spezifisch für bestimmte Stoffwechselfparameter.

Es ist auch denkbar, daß mehrere der genannten Faktoren zusammenwirken und so den scheinbaren Widerspruch der Beobachtungen hervorrufen.

4.3 Vergleich der Ergebnisse der in-vitro-Versuche mit klinischen Beobachtungen

In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen Hypertriglyceridämie und eingeschränkter Glucosetoleranz an Patienten untersucht. Eine Verschlechterung der Glucosetoleranz wurde dabei nicht nur an adipösen Personen beobachtet, sondern auch an schlanken Patienten mit erhöhten Triglycerid-Plasmaspiegeln. Nach oraler Glucosebelastung reagierten diese Patienten mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie (30). Eine Behandlung der Hypertriglyceridämie mit lipidsenkenden Pharmaka (Clofibrat) bewirkte oft gleichzeitig eine Verbesserung der Glucosetoleranz (12). Bei solchen Patienten konnten verringerte Insulin-

rezeptorzahlen an Erythrozyten und Monozyten nachgewiesen werden (5). Für diese Beobachtungen gibt es mehrere mögliche Erklärungen.

- 1) Im Einklang mit den in-vitro-Ergebnissen von Steiner et al. könnten VLDL selbst die Insulinrezeptorbindung herabsetzen und so die Insulinwirkung beeinträchtigen. Die postprandiale Hyperinsulinämie könnte ein Versuch der Gegenregulation mit dem Ziel sein, die Glucosehomöostase aufrechtzuerhalten. Die Ergebnisse unserer Studie sprechen jedoch deutlich gegen eine solche Wirkung der VLDL an der Leber; es ist auch unwahrscheinlich, daß eine solche geringfügige Verschlechterung der Insulinrezeptorbindung an anderen Organen, die die Leber nicht betrifft, eine größere Störung des Glucosestoffwechsels hervorrufen könnte.
- 2) Eine andere Erklärungsmöglichkeit für die verringerte Insulinrezeptorzahl an den von Bieger et al. (5) untersuchten Zellen hypertriglyceridämischer Patienten bestände in Defekten sowohl am Insulinrezeptor als auch im VLDL-Metabolismus, die möglicherweise gekoppelt vererbt oder erworben werden. Eine Erhöhung des VLDL-Spiegels im Blut hätte dann keinen direkten Einfluß auf die Insulinrezeptorkapazität und -affinität, was mit unseren Ergebnissen in Einklang stände.
- 3) Schließlich könnte die an hypertriglyceridämischen Patienten beobachtete Insulinresistenz auch durch einen primären Defekt, der verschlechterte Glucoseverarbeitung auf zellulärer Ebene zur Folge hat, erklärt werden. Die Zelle müßte dann verstärkt auf Triglyceride zur Energiegewinnung zurückgreifen; dies könnte erhöhten Triglyceridumsatz und damit eine vermehrte VLDL-Produktion durch die Leber erklären. Die durch den reduzierten Glucoseverbrauch resultierende Hyperglykämie hätte eine kompensatorische Hyperinsulinämie zur Folge. Es ist bekannt, daß Hyperinsulinämie die Insulinrezeptoren "downregulieren" kann; d.h. deren Anzahl nimmt mit steigendem Insulinspiegel ab (22).

Die bei vielen Diabetikern zu beobachtende geringfügige Erhöhung des LDL-Spiegels (34) hat ebenfalls keinen in vitro nachzuvollziehenden direkten Einfluß auf den Insulinrezeptor (allerdings wurden in unseren Versuchen nur physiologische LDL-Konzentrationen untersucht).

Komplexere Zusammenhänge zwischen Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel - und damit zwischen Hyperlipidämie und Diabetes - in vivo können nicht ausgeschlossen werden; ein direkter Einfluß der VLDL oder LDL auf den Insulinrezeptor im Sinne einer verringerten Insulinbindung oder eines Postrezeptoreffektes ist nach unseren Ergebnissen, zusammenfassend gesehen, jedoch kaum zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Eine durch erhöhte Lipoproteinspiegel induzierte Insulinresistenz wurde wiederholt postuliert. Um diese Hypothese zu überprüfen, untersuchten wir, ob VLDL- oder LDL-Lipoproteine die Insulinbindung bzw. -wirkung an in vitro kultivierten Hepatomazellen verändern. Dazu wurden FAO-Hepatomazellen der Ratte und HEP-G2-Zellen, eine humane Hepatomazelllinie, über 20 Stunden mit VLDL und LDL inkubiert. Danach wurde die spezifische Insulinrezeptorbindung mit ^{125}J -markiertem Insulin und die Glykogensynthese aus radioaktiv markierter Glucose gemessen.

VLDL-Lipoproteine ($d < 1,006 \text{ g/ml}$) in physiologischer ($0,5 \text{ mg/ml}$) oder supraphysiologischer (5 mg/ml) Konzentration bewirkten keine Veränderung der Insulinrezeptorbindung an beiden Zelllinien. Dies galt für VLDL aus normalem, gepooltem menschlichem Serum, aus dem Serum von Diabetikern und aus dem Plasma streptozotocin-diabetischer Ratten. LDL ($d = 1,019 - 1,063 \text{ g/ml}$) aus normalem, gepooltem Humanserum veränderten ebenfalls die Insulinrezeptorbindung nicht. Auch die Glykogensynthese aus radioaktiv markierter Glucose wurde durch die verschiedenen VLDL-Präparationen nicht verändert.

VLDL und LDL konnten also an Hepatomazellen in Kultur keine Insulinresistenz auf Rezeptor- oder Postrezeptorebene hervorrufen. Eine Insulinresistenzinduktion oder -verstärkung durch VLDL oder LDL, die besonders in der Pathogenese des Typ II-Diabetes mellitus von Bedeutung sein könnte, muß daher zumindest in Frage gestellt werden.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

DME-Medium	Dulbecco's Minimal Essential Medium
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
FKS	Fötales Kälberserum
IDL	Intermediate Density Lipoproteins
LDL	Low Density Lipoproteins
LPDS	Lipoprotein Deficient Serum
MDA-LDL	Malondialdehyd-modifizierte LDL
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
TG	Triglyceride
VLDL	Very Low Density Lipoproteins

Literaturverzeichnis

- 1) Arbogast, B. W., Lee, Greta M., Raymond, T. L.:
In vitro injury of porcine aortic endothelial cells by
very-low-density-lipoproteins from diabetic rat serum
Diabetes 31 (1982), 593 - 599
- 2) Bar-On, H., Roheim, P. S., Eder, H. A.:
Serum lipoproteins and apolipoproteins in rats with strepto-
zotocin-induced diabetes
The Journal of Clinical Investigation 57 (1976), 714 - 721
- 3) Berliner, J. A., Frank, J. L., Karasic, D., Capdeville, M.:
Lipoprotein-induced insulin resistance in aortic endothelium
Diabetes 33 (1984), 1039 - 1044
- 4) Bernaert, D., Wanson, J. C., Drockmans, P., Popowski, A.:
Effect of insulin on ultrastructure and glycogenesis in
primary cultures of adult rat hepatocytes
Journal of Cell Biology 74 (1977), 878 - 900
- 5) Bieger, W. P., Michel, G., Barwich, D., Biehl, K., Wirth, A.:
Diminished insulin receptors on monocytes and erythrocytes
in hypertriglyceridemia
Metabolism 33 (1984), 982 - 987
- 6) Chan, S.-Y., Pollard, M.:
In vitro effects of lipoprotein-associated cytotoxic factor
on rat prostate adenocarcinoma cells
Cancer Research 38 (1978), 2956 - 2961
- 7) Chapman, M. J.:
Animal lipoproteins: chemistry, structure and comparative
aspects
Journal of Lipid Research 21 (1980), 790 - 853

- 8) Crettaz, M., Kahn, R.:
Analysis of insulin action using differentiated and de-
differentiated hepatoma cells
Endocrinology 113 (1983), 1201 - 1209
- 9) Dashti, N., Wolfbauer, G., Koren, E., Knowles, B.,
Alaupovic, P.:
Catabolism of human low density lipoproteins by human
hepatoma cell line HEP-G2
Biochim. et Biophys. Acta 794 (1984), 373 - 384
- 10) Dunn, F. L.:
Hyperlipidemia and Diabetes
Medical Clinics of North America 77 (1982), 1347 - 1360
- 11) Eaton, R. P., Nye, W. H. R.:
The relationship between insulin secretion and triglyceride
concentration in endogenous lipemia
J. Lab. Clin. Medicine 81 (1975), 682 - 695
- 12) Ferrari, C., Frezzati, S., Romussi, M., Bertazzoni, A.,
Testori, G. P., Antonini, S., Paracchi, A.:
Effects of short-term clofibrate administration on glucose
tolerance and insulin secretion in patients with chemical
diabetes or hypertriglyceridemia
Metabolism 26 (1977), 129 - 139
- 13) Gabor, J., Spain, M., Kalant, N.:
Composition of serum very-low-density lipoproteins in
diabetes
Clinical Chemistry 26 (1980), 1261 - 1265
- 14) Gianturco, Sandra H., Eskin, Suzanne G., Navarro, Lydia T.,
Lahart, C. J., Smith, L. C., Gotto, A. M.:
Abnormal effects of hypertriacylglycerolemic very-low-
density-lipoproteins on 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-
reductase activity and viability of cultured bovine aortic

endothelial cells

Biochemia et Biophys. Acta 618 (1980), 143 - 152

15) Goldberg, R. B.:

Lipid disorders in diabetes

Diabetes Care 5 (1981), 561 - 572

16) Greenfield, M., Kolterman, O., Olefsky, J., Reaven, G. M.:

Mechanism of hypertriglyceridemia in diabetic patients
with fasting hyperglycaemia

Diabetologia 18 (1980), 441 - 446

17) Gries, F. A., Koschinsky, I., Berchtold, P.:

Obesity, diabetes and hyperlipoproteinemia

Atherosclerosis Rev. 4 (1979), 71 - 95

18) Gries, F. A., Vogelberg, K. H., Koschinsky, I.:

Fettstoffwechselstörungen bei Diabetes mellitus

Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 87 (1981), S. 1515

19) Henriksen, T., Evensen, S. A., Carlander, B.:

Injury to human endothelial cells in culture induced by
low-density-lipoproteins

Scand. J. Clin. Lab. Invest. 39 (1979), 361 - 368

20) Hessler, J. R., Morel, Diane W., Lewis, J., Chisolm, G. M.:

Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity

Arteriosclerosis 3 (1983), 215 - 222

21) Iwamoto, Y., Wong, K. Y., Goldfine, Ira D.:

Insulin action in cultured HTC and H 35 rat hepatoma cells:
Receptor binding and hormone sensitivity

Endocrinology 108 (1981), 44 - 51

- 22) Kemmler, W., Häring, H. U.:
Insulin binding and action in antibody-induced diabetes
in the rat
Diabetologia 23 (1982), 517 - 520
- 23) Kollegium Biomathematik NW (Hrsg.):
Biomathematik für Mediziner
Springer-Verlag 1976, S. 168 f.
- 24) Lisch, H. J., Sailer, S.:
Lipoprotein patterns in diet, sulphonylurea and insulin
treated diabetics
Diabetologia 20 (1981), 118 - 122
- 25) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. L.:
Protein measurement with the fohn phenol reagent
J. Biol. Chem. 193 (1951), 265 - 275
- 26) Olefsky, J. M.:
Insulin resistance and insulin action - an in vitro and in
vivo perspective
Diabetes 30 (1981), 148 - 161
- 27) Peter, Gernot:
Lehrbuch der klinischen Chemie, 3. Auflage
Verlag Chemie, Weinheim 1982, S. 159
- 28) Podskalny, J. M., Takeda, S., Silverman, R., Iran, D.,
Carpentier, J. C., Orci, L., Gorden, P.:
Insulin receptors and bioresponses in a human liver cell
line (HEP-G2)
European J. Biochem. 150 (1985), 401 - 407
- 29) Reaven, G. M., Greenfield, M. S.:
Diabetic hypertriglyceridemia: evidence for three clinical
syndromes
Diabetes 30 (Suppl. 2, 1981), 66 - 75

- 30) Reaven, G. M., Mejean, L., Villaume, C., Drouin, P.,
Debry, G.:
Plasma glucose and insulin responses to oral glucose in
nonobese subjects and patients with endogenous hypertri-
glyceridemia
Metabolism 32 (1983), 447 - 450
- 31) Richards, G. M.:
Modification of the diphenylamine reaction giving increased
sensitivity and simplicity in the estimation of DNA
Anal. Biochem. 57 (1974), 369 - 376
- 32) Rinninger, F., Kirsch, D., Häring, H. U., Kemmler, W.:
Extrapankreatic action of the sulphonylurea gliquidone:
post-receptor-effect on insulin-stimulated glycogen
synthesis in rat hepatocytes in primary culture
Diabetologia 26 (1984), 865 - 874
- 33) Simpson, R. W., Mann, J. I., Hockaday, T. D. R., Hockaday,
J. M., Turner, R. C., Jelfs, R.:
Lipid abnormalities in untreated maturity-onset-diabetics
and the effect of treatment
Diabetologia 16 (1979), 101 - 106
- 34) Sosenko, J. M., Breslow, J. L., Miettinen, O. S., Gabbay,
K. H.:
A prospective study of young insulin-dependent diabetic
patients
New England Journal of Medicine 302 (1980), 650 - 654
- 35) Steiner, G.:
Insulin and Hypertriglyceridemia
Diabetes, ed. W. K. Waldhaus, Amsterdam: Excerpta Medica
(1979), 590 - 593

- 36) Steiner, G., Morita, S., Vranic, M.:
Resistance to insulin but not to glucagon in lean human
hypertriglyceridemics
Diabetes 29 (1980), 899 - 905
- 37) Steiner, G., Vranic, M.:
Hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, a vicious
circle with atherogenic potential
Internat. J. Obesity 6 (1982), Suppl. 1, 117 - 124
- 38) Verspohl, E. J., Roth, R. A., Vigneri, R., Goldfine, Ira D.:
Dual regulation of glycogen metabolism by insulin and
insulin-like growth factors in human hepatoma cells (HEP-G2)
J. Clin. Invest. 74 (1984), 1436 - 1443
- 39) Weisweiler, P., Drosner, M., Schwandt, P.:
Dietary effects on very-low-density-lipoproteins in type II
(non-insulin-dependent) diabetes mellitus
Diabetologia 23 (1982), 101 - 103

Lebenslauf

Geburtsdatum: 2. August 1961

Geburtsort: Regensburg

Nationalität: Deutscher

Eltern: Jakob und Mechthild Wolf, geb. Ludwig

Schule: 1967 - 1971: Grundschule Regensburg-West
1971 - 1981: Goethe-Gymnasium Regensburg
26.6.1981: Reifezeugnis

Studium: November 1981: Beginn des Humanmedizinstudiums
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dissertation: 1984: Beginn vorliegender Arbeit unter Leitung
von Herrn Prof. Dr. W. Bachmann am Institut
für Diabetesforschung, München

Staatsexamen: 13. November 1987

Approbation: 26. November 1987

